CAMILA DE OLIVEIRA RODINI

**EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DE GENES HOMEBOX NO
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA: ANÁLISE POR
MICROARRAY, VALIDAÇÃO POR qRT-PCR E RELAÇÃO COM
CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AGRESSIVIDADE**

São Paulo

2008

Camila de Oliveira Rodini

**Expressão de transcritos de genes homeobox no carcinoma
epidermóide de boca: análise por microarray, validação por qRT-
PCR e relação com critérios clínicos de agressividade**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São
Paulo, para obter o título de Doutor,
pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2008

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Rodini, Camila de Oliveira

Expressão de transcritos de genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca: análise por microarray, validação por qRT-PCR e relação com critérios de agressividade / Camila de Oliveira Rodini; orientador Fabio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2008.

118p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Genes homeobox – Carcinoma de células escamosas 2. Patologia bucal

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADA AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rodini CO. Expressão de transcritos de genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca: análise por microarray, validação por qRT-PCR e relação com critérios clínicos de agressividade [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, __/__/____.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, Elaine e Bruno, pelo amor mais puro e belo, apoio sem fim, e participação importante na minha vida. Tenho muito orgulho e admiração por vocês e pela família que somos.

À minha querida irmã Carol, pelo amor e pela verdadeira amizade. A cada dia crescemos juntas, trilhando caminhos semelhantes. Nossa união é forte e para toda a vida.

Ao querido Eduardo, que representa o “amor que constrói”, sempre ao meu lado, mesmo que às vezes longe. Estar junto de você me faz uma pessoa melhor e mais feliz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes**, agradeço pela receptividade inicial e oportunidade de aprender muito com este e outros trabalhos. Sempre que reflito sobre minha vinda para o seu laboratório vejo o quanto cresci como pesquisadora.

À professora **Dra Suzana C. Orsini Machado de Sousa**, quem primeiro me recebeu com toda sua simpatia e carinho na disciplina de Patologia Bucal. Agradeço por compartilhar comigo um pouco de seu conhecimento e pela delicadeza ao ensinar.

Aos professores **Dra Marina Helena C. G. de Magalhães, Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, Dra Marília Trierveiler Martins, Dra Andréa Mantesso e Dra Karen Lopes Ortega**, agradeço pelos valiosos ensinamentos da rotina diagnóstica, pelo convívio agradável e integração com todos os alunos da pós-graduação.

À minha querida professora **Dra Vanessa Soares Lara**, orientadora de Mestrado que entendeu minhas expectativas em fazer o Doutorado na FOU SP e me apoiou com carinho. Agradeço pela acolhida desde a iniciação científica, pela amizade, pelo reconhecimento e estímulo.

Ao **Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto**, meu co-orientador, agradeço pela participação fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Admiro sua competência, facilidade de raciocínio científico e capacidade de integração.

À **Dra Sílvia Regina Caminada de Toledo**, Coordenadora do Laboratório de Genética do Instituto de Oncologia Pediátrica do GRAACC, agradeço pela confiança em me receber em seu laboratório para a realização de parte deste trabalho.

À professora **Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva**, coordenadora do Projeto Temático “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço” (FAPESP 04/12054-9), agradeço pela ajuda fundamental na obtenção das amostras utilizadas neste trabalho, pela confiança em utilizar seu laboratório e pelo carinho. Agradeço, também, pela ajuda do **Rodrigo** e da **Bianca** no processamento das amostras.

Aos pesquisadores envolvidos no grupo **GENCAPO**, agradeço por participar das ricas discussões construtivas que foram muito importantes para o meu aprendizado crescente na pesquisa do câncer de cabeça e pescoço.

Às queridas amigas **Flávia, Taty e Kati**, companheiras do laboratório de Patologia Molecular da FOU SP, agradeço por deixarem o ambiente leve e alegre, sem comprometer a seriedade da pesquisa, além da sincera amizade, companheirismo, conversas de trabalho e desabafos pessoais.

A todos os amigos queridos que trabalham no laboratório de Patologia Molecular, em especial, **Patrícia Adashi, Fábio Coracin, Ricardo Shié e Camila Gallo** pelo convívio, respeito, troca de conhecimentos e amizade nesses últimos anos.

Aos novos membros da família da biologia molecular, **Maria Fernanda, Fernanda, Fernanda e Mônica**, agradeço pela amizade fácil que surgiu.

Às colegas de laboratório **Márcia Campos e Thaís Acquafreda**, que também contribuíram para meu aprendizado científico e pessoal.

Aos queridos colegas de “turma” e amigos **Hélder, Flávia e Cury**, agradeço pelos momentos de alegria, pelas conversas, pelos lanches no Valtinho, pelas caronas e pela oportunidade de trabalharmos juntos. A generosidade e amizade de vocês são valiosas.

Aos queridos alunos da disciplina de Patologia Bucal, **Luciana, Brunno, Tessa, Paulo Santos, Marina, Yonara, Kívia, Alexandre Fraige, Fernandinha, Érica, Alexandra, Aluana, Fernanda Giudice, Fátima, Alexandre Medeiros, Juliana, Roberto, Cristiane Barbosa, Fabiana, Márcio, Paulo Braz, Karen Hiraki, Natali, Renata Acay e Aline**, agradeço pelo coleguismo e convivência harmoniosa.

Ao **Serginho**, agradeço pela receptividade, pelas reflexões e pelo carinho.

A todas as funcionárias da Disciplina de Patologia Bucal, **Edna (*in memorium*)**, **Zilda, Néia, Nair, Patrícia, Elisa, Bia e Débora** pelo convívio, carinho e pela presteza sempre que foi preciso.

Ao apoio financeiro recebido do **Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, indispensável para minha estadia em São Paulo para cursar o doutorado na Patologia Bucal.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP)** pelo financiamento deste projeto e do projeto temático, do qual esse trabalho também fez parte.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no doutorado da FOU SP.

Há pessoas que nos falam e nem as escutamos; Há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam. Mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em nossa vida...

E que marcam para sempre...

Cecília Meireles

Rodini CO. Expressão de transcritos de genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca: análise por microarray, validação por qRT-PCR e relação com critérios clínicos de agressividade [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

A busca de marcadores moleculares para o refinamento diagnóstico, classificação e estabelecimento do prognóstico dos tumores, e individualização terapêutica tem sido foco de várias pesquisas. O presente estudo teve como objetivo investigar, em carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, a presença de transcritos dos genes *homeobox* que pudessem se revelar marcadores moleculares de prognóstico e/ou agressividade tumoral. Após análise por *microarray* utilizando-se amostras de tumores e margens classificados como mais e menos agressivos, os genes *homeobox* *HOXC13*, *HOXD10*, *HOXD11*, *IRX4*, *PROX1* e *ZHX1* foram selecionados e sua hiper-expressão foi parcialmente validada por qRT-PCR. Observou-se aumento da expressão de *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* em tumores com relação às margens correspondentes, bem como nos tumores menos agressivos em relação às suas respectivas margens. Por outro lado, os genes *PROX1* e *ZHX1* estavam mais expressos nas margens que nos tumores correspondentes. Esses resultados sugerem que a expressão alterada de *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* pode participar no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, enquanto os genes *PROX1* e *ZHX1* provavelmente exibem perda de função ou estão silenciados na neoplasia. Houve uma tendência de associação entre a expressão elevada de *HOXD11* e presença de infiltrações linfática e perineural, e grau moderado de diferenciação da neoplasia, bem como entre a expressão elevada de *HOXD10* e infiltração linfática. O gene *IRX4* foi relacionado com um menor tempo de sobrevida global. Não foi possível estabelecer, dentre os genes *homeobox* validados por qRT-PCR, um gene ou uma combinação deles que pudesse(m) ser utilizado(s) como marcador(es) de agressividade tumoral.

Palavras-Chave: Genes homeobox - Carcinoma epidermóide de boca – qRT-PCR

Rodini CO. Homeobox genes transcripts expression in oral squamous cell carcinoma: microarray analysis, qRT-PCR validation and association with clinical criteria of aggressiveness [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

The search for molecular markers to diagnosis improvement, treatment individualization and establishment of oral squamous cell carcinoma prognosis has been the focus of several studies. The present study investigated the presence of specific transcript of homeobox genes in squamous cell carcinoma of the tongue and/or floor of the mouth that might reflect relevant molecular markers of prognosis and/or tumor aggressiveness. After microarray analysis of tumor samples classified as more or less aggressive, and non tumoral margins, *HOXC13*, *HOXD10*, *HOXD11*, *IRX4*, *PROX1* and *ZHX1* selected and partially validated by qRT-PCR. Increased expression of *HOXD10*, *HOXD11*, *IRX4* in tumors in comparison to margins as well as in less aggressive tumors related to their margins was observed. On the other hand, a decreased expression of *PROX1* and *ZHX1* was observed in margins compared to their respective tumors. These results suggest that the altered expression of *HOXD10*, *HOXD11* and *IRX4* may participate in the development of squamous cell carcinoma of the tongue and/or floor of the mouth, while *PROX1* and *ZHX1* probably present loss of function or are silenced in tumors. A tendency of association between increased expression of *HOXD11* and lymphatic and perineural infiltration, as well as moderately differentiated tumors, and increased expression of *HOXD10* and lymphatic infiltration was observed. Still, increased expression of *IRX4* may apparently influence global survival rate. However, the results of the present study must be confirmed in a greater number of samples, and complemented with the evaluation of *HOXD10*, *HOXD11*, *IRX4* protein levels. It was not possible to establish, among homeobox genes validated through qRT-PCR, a gene or a combination of genes capable of predicting tumor aggressiveness.

Palavras-Chave: Homeobox Genes - Oral squamous cell carcinoma – qRT-PCR

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Estrutura hélice-giro-hélice do homeodomínio, mostrando a região da terceira hélice interagindo no sulco maior do DNA de maneira seqüência-específica.....29
- Figura 2.2 - Conservação das famílias de genes *Hom-C* e *HOX*. Os quatro grupamentos *HOX* (A, B, C e D) localizados nos cromossomos indicados à direita mostram o alinhamento paralelo, revelando a existência de 13 grupos parálogos cujos membros estão representados pelas caixas de mesma cor31

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Seqüências dos iniciadores utilizados para amplificação por qPCR segundo o gene-alvo, número de acesso no <i>Gene Bank</i> , a orientação e o tamanho do produto	50
Tabela 5.1 -	Número e porcentagens de pacientes segundo consumo de álcool e tabaco, características clínicas e histopatológicas	56
Tabela 5.2. -	Amostras de tumores selecionadas para experimentos em <i>microarrays</i>	57
Tabela 5.3 -	Análise dos genes <i>homeobox</i> hiper-expressos em 10 amostras de tumores mais e menos agressivos, com relação ao pool de tecidos não tumorais correspondentes.....	59
Tabela 5.4 -	Informações dos processos biológicos e funções moleculares baseados no <i>Gene Ontology</i> para os genes diferencialmente expressos revelados pela análise dos dados do <i>microrarray</i>	60
Tabela 5.5 -	Comparação das medianas da expressão segundo dois grupos definidos como tumor e margem	62
Tabela 5.6 -	Comparação das medianas da expressão dos genes segundo quatro grupos definidos como margens e tumores mais e menos agressivos.....	64
Tabela 5.7 -	Múltiplas comparações das medianas de expressão dos genes entre cada dois grupos de interesse	65
Tabela 5.8 -	Análise da curva ROC na definição de pontos de corte para diagnóstico de tumor.....	67
Tabela 5.9 -	Análise da curva ROC na definição de pontos de corte para agressividade	68

- Tabela 5.10 - Resultado do teste exato de Fisher para associação entre expressão dos genes *homeobox* com os dados clínicos e histopatológicos. Em negrito, observam-se os resultados que apresentaram valores de p mais próximos da significância.....69
- Tabela 5.11 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD10* em relação à presença de infiltração linfática..... 69
- Tabela 5.12 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD11* em relação à presença de infiltração linfática.....69
- Tabela 5.13 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD11* em relação ao grau de diferenciação histopatológica ..70
- Tabela 5.14 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD11* em relação à presença de infiltração perineural..... 70
- Tabela 5.15 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *ZHX1* em relação à interação fumo e álcool...70
- Tabela 5.16 - Probabilidade de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier.73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 –	Gráficos dos valores das medianas de expressão de cada gene, de acordo com os grupos tumor e margem.	62
Gráfico 5.2 –	Gráficos dos valores das medianas de expressão de cada gene, de acordo com os grupos de tumores mais e menos agressivos, bem como nas suas margens correspondentes	66
Gráfico 5.3 -	Comparação das curvas de Kaplan-Meier com relação à agressividade tumoral (A) e intensidade do infiltrado inflamatório (B).....	74
Gráfico 5.4 –	Comparação das curvas de Kaplan-Meier com relação ao ponto de corte da expressão de <i>ZHX1</i> para agressividade (A) e com relação ao ponto de corte da expressão de <i>IRX4</i> para diagnóstico de tumor (B).....	74
Gráfico 5.5 –	Comparação das curvas de Kaplan-Meier com relação ao ponto de corte da expressão de <i>HOXD10</i> (A), <i>HOXD11</i> (B) para diagnóstico de tumor e de <i>PROX1</i> (C) para diagnóstico de agressividade.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
°C	graus Celsius
aa	aminoácidos
Abd-B	do Inglês “Abdominal-B gene”
ACTB	do Inglês “actin beta”
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	do Inglês “protein kinase B”
cDNA	do Inglês “complementary desoxyribonucleid acid”
CDX1	do Inglês “caudal type homeobox1”
CTTN	do Inglês “cortactin”
CXCL1	do Inglês “Chemokine (C-X-C motif) ligand 1”
DNA	do Inglês “desoxyribonucleid acid”
EEF1A1	do Inglês “eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1”
EGF	do Inglês “epidermal growth factor”
FGF	do inglês “fibloblast growth factor” ou fator de crescimento fibroblástico
FKHR	do Inglês “forkhead gene”
HER2	do Inglês “Human Epidermal growth factor Receptor-type 2”
HOM-C	complexo homeótico da <i>Drosophila</i>
HOX	genes HOX (homeobox agrupados)
HPRT	do Inglês “hypoxantine phosphoridrosyl transferase”
IL	interleucina

IRX4	do Inglês “Iroquois 4 gene”
KIP	do Inglês “cyclin-dependent kinase inhibitor”
MLL	do Inglês “myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia”
MMP	metaloproteinase
mRNA	do Inglês “messenger ribonucleid acid”
MSX	do Inglês “muscle segmente homeobox”
NCBI	do inglês “National Center for Biotechnology Information”
NKX3.1	do Inglês “NK3 homeobox 1”
NUP98	do Inglês “nucleoporin 98kDa gene”
OCT-4	do Inglês “Octamer”
PAX	gene humano homólogo ao gene Pax (“paired”) da <i>Drosophila</i>
pb	pares de base
PDX1	do Inglês “pancreatic and duodenal homeobox 1”
PITX1	do Inglês “paired-like homeodomain transcription factor 1”
POU5f1	do Inglês “POU class 5 homeobox 1”
PROX1	do Inglês “prospero homeobox 1”
PTEN	do Inglês “phosphatase and tensin homolog”
Quox-1	do Inglês “quail homeobox-containing gene”
ras	do Inglês “rat sarcoma virus”, proto-oncogene e proteína ras
RNA	do Inglês “ribonucleid acid” ou ácido ribonucléico
ROC	do Inglês “Receiver Operating Characteristic”
qRT-PCR	do Inglês “quantitative reverse transcriptase polimerase chain reaction
TNM	estadiamento TNM, T= tumor; N= linfonodos e M= metástases a distância.
UICC	do Francês “Union internationale Contre Le Cancer”
ZHX1	do Inglês “Zinc fingers and homeoboxes 1 gene”

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Carcinoma epidermóide de boca	21
2.1.1 Sistema de classificação TNM	22
2.1.2 Aspectos moleculares	24
2.1.2.1 Ferramentas de biologia molecular na análise da expressão gênica	26
2.2 Fisiologia dos genes homeobox	28
2.3 Genes homeobox e oncogênese	32
2.3.1 Genes homeobox em carcinoma epidermóide de boca	40
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Amostras biológicas	43
4.2 Dados dos pacientes	44
4.3 Obtenção do RNA total	45
4.4 Estudo da expressão gênica global por <i>microarray</i>	46
4.5 Confecção do cDNA por meio de transcrição reversa do RNA	48
4.6 Análise quantitativa da expressão gênica por qRT-PCR	49
4.7 Análise estatística dos resultados	51
5 RESULTADOS	55
5.1 Caracterização da amostra	55
5.2 Genes <i>homeobox</i> hiper-expressos na análise dos dados de <i>microarray</i>	57

5.3 Expressão gênica dos <i>homeobox</i> analisada por qRT-PCR	61
5.3.1 Comparação das medianas da expressão segundo tumor e margem	61
5.3.2 Comparação das medianas da expressão segundo tumor e margem, conforme agressividade	63
5.4 Definição dos pontos de corte da curva ROC	67
5.5 Associação entre expressão dos genes <i>HOX</i>, variáveis clínicas e histopatológicas	68
5.6 Análise de sobrevida	71
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	98
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide bucal é uma neoplasia epitelial maligna agressiva, freqüentemente associada com prognóstico pobre, cuja taxa de sobrevida em cinco anos permanece baixa (ao redor de 50%) e inalterada nos últimos 40 anos apesar de grandes avanços nos tratamentos cirúrgico, radioterápico e quimioterápico. O recurso diagnóstico utilizado como rotina é o exame histopatológico e, ao contrário do receptor de estrógeno ou HER2 em câncer de mama, nenhum biomarcador está atualmente disponível para a avaliação do prognóstico das neoplasias de cabeça e pescoço, incluindo as de boca, que dependem grandemente do estágio ao diagnóstico, sendo o fator prognóstico mais importante a presença de metástase cervical nodal (GREENBERG et al., 2003).

A oncogênese tem sido relacionada por vários estudos com o desenvolvimento embrionário, já que ambos os processos são dependentes, de forma diferente, da proliferação e diferenciação celulares. Nesse aspecto, os genes de desenvolvimento embrionário, como os da família *homeobox*, aparecem como alvos interessantes de pesquisas científicas. Apesar de muitos estudos relatarem a expressão desregulada e diferencial de genes *homeobox* em diversas neoplasias, entre elas as neoplasias hematológicas (LA STARZA et al., 2003; PANAGOPOULOS et al., 2003; TAKETANI et al., 2002a), câncer de mama (CARRIO et al., 2005; FISHER et al., 2000; MORINI et al. 2000) e, mais recentemente, em carcinoma epidermóide de boca (HASSAN et al., 2006; ZHU et al., 2004), existe uma dificuldade em se definir as vias de sinalização das quais estes genes efetivamente participam durante a carcinogênese.

Propusemo-nos a estudar os genes *homeobox* inicialmente caracterizados como hiper-expressos em amostras tumorais de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, após análise do perfil de expressão gênica global por meio da tecnologia de microarranjo. Foram selecionados alguns genes *homeobox* para quantificação por qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa) na intenção de validar os dados obtidos por microarranjo e relacionar um gene ou um grupo desses genes com a agressividade do carcinoma epidermóide de boca. As possíveis diferenças de expressão dos genes *homeobox* foram verificadas em carcinomas epidermóides de língua e/ou assoalho bucal, conforme sua agressividade, e também em relação às suas margens morfológicamente não tumorais correspondentes. Por fim, procurou-se relacionar o grau de expressão desses genes com aspectos clínicos, histopatológicos bem como sobrevida dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

A estimativa de incidência de câncer no Brasil para 2008 aponta o câncer de boca como o quinto mais freqüente entre os homens (com 10.380 casos estimados) e o sétimo entre as mulheres (com 3.780 casos estimados). A região sudeste seria responsável em média por 56,6% de todos os casos de câncer de boca no país, com estimativas de 8010 casos novos, sendo que o carcinoma epidermóide representa cerca de 95% do total das neoplasias bucais malignas (BRASIL, 2007).

O carcinoma epidermóide de boca, também denominado de carcinoma espinocelular, carcinoma de células escamosas e carcinoma escamocelular, é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento. Apesar de alguns centros relatarem uma modesta melhora no curso da lesão durante os últimos 20 anos, o câncer de boca continua evoluindo com prognóstico desfavorável em relação à sobrevida de cinco anos e tempo livre de doença, estimados em 56% e 58% respectivamente (KADEMANI et al., 2005; PATEL; SHAH, 2003).

O perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide de boca está representado principalmente por homens acima dos 40 anos de idade, tabagistas e freqüentemente etilistas, o que potencializa o efeito do tabaco. Os locais mais acometidos na cavidade bucal são língua e assoalho bucal (BRENER et al., 2007), e as metástases são predominantemente locais ou regionais, envolvendo

principalmente os linfonodos cervicais superiores (BRANDÃO; CAVALHEIRO; SONDERMANN, 2000).

Atualmente, a terapia do carcinoma epidermóide de boca consiste em cirurgia isolada ou associada à radioterapia; porém, nos casos mais avançados em que a cirurgia não é indicada, a quimioterapia associada à radioterapia pode ser empregada. Ainda assim, a taxa de sobrevida em cinco anos é considerada baixa.

O recurso diagnóstico utilizado de rotina é o exame histopatológico, baseado na análise da morfologia tecidual. Atualmente estudos moleculares e imuno-histoquímicos, associados aos dados histopatológicos e clínicos, têm tentado caracterizar os diversos eventos envolvidos no processo de carcinogênese, e visado também encontrar marcadores específicos que possam trazer contribuições não somente para o diagnóstico, como também para o prognóstico e a terapêutica (MITTELDORF, 2000).

2.1.1 Sistema de Classificação TNM

De maneira geral, a sobrevida do paciente com câncer de boca é modificada de acordo com o estadiamento da doença. De acordo com Gloeckner (1994), quando a doença é localizada a sobrevida é de 79%, já na doença loco-regional é de 42% e quando há presença de metástases distantes é de 19%.

O sistema de classificação TNM, adotado pela *Union Internationale Contre le Cance* (UICC, 1992) e pela American Joint Committee on Cancer (American Cancer

Society, 1997), considera a extensão do tumor primário (T) e a presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais (N) ou à distância (M), fornecendo uma base confiável para o planejamento terapêutico e prognóstico.

O TNM é avaliado em duas etapas, uma pré e outra pós-tratamento cirúrgico. Na etapa pré-tratamento, classificada como cTNM, estão incluídos exame físico, diagnóstico por imagem, biópsia e exploração cirúrgica. Na etapa pós-tratamento, definida como pTNM, considera-se a avaliação histopatológica, importante para se definir se o carcinoma é *in situ* ou apresenta extensão local (pT), se há comprometimento linfonodal após análise de pelo menos 10 linfonodos (pN), e se há metástase a distância. A segunda etapa de análise TNM, pelo exame histopatológico, é imprescindível já que uma lesão classificada como T1 ($\leq 2\text{cm}$) pode apresentar comprometimento linfonodal (N+) não detectado clinicamente, enquanto que uma lesão definida como T4 ($> 4\text{cm}$) não necessariamente apresenta metástase regional (N0) (BRASIL, 2004).

A análise de linfonodos regionais comprometidos é crítica em câncer de boca, porque mesmo lesões iniciais, especialmente localizadas em língua e assoalho bucal, podem apresentar disseminação subclínica em 10 a 20% dos casos, e a presença de metástase cervical é ainda o fator prognóstico mais importante no carcinoma epidermóide bucal (KADEMANI et al. 2005). Quando o tumor primário é tratado exclusivamente, na vigência de uma metástase cervical oculta, há sensível redução na sobrevida dos pacientes, de maneira que a seleção de pacientes para esvaziamento cervical é realizada através de características clínicas do tumor, como seu tamanho e localização (RUSSOLO et al., 2002).

Embora o sistema de estadiamento TNM seja uma ferramenta de prognóstico útil, o comportamento biológico de tumores individuais permanece imprevisível. Isto

é, existem pacientes com doença localmente avançada que apresentam desenvolvimento lento de metástases, enquanto lesões menores podem apresentar envolvimento precoce dos linfonodos regionais, exibindo um curso clínico mais agressivo. Espera-se, então, que a habilidade de prever quais lesões primárias serão capazes de gerar metástases precocemente permita uma terapia individualizada, mais ou menos conservadora. Nesse contexto que se inserem os estudos que buscam biomarcadores moleculares de comportamento e agressividade tumoral.

2.1.2 Aspectos moleculares

Embora vários estudos já identificaram anormalidades genéticas presentes em neoplasias de boca e de cabeça e pescoço de maneira geral, ainda não há um perfil genético estabelecido. Existem evidências do envolvimento de aberrações genéticas nessas neoplasias, em ordem de frequência, nos cromossomos 9, 3, 17, 13 e 11, além de outras regiões cromossômicas (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). Devido ao fato dessas regiões possuírem genes supressores tumorais, como *FHIT*, localizado no cromossomo 3p14, e *p16*, localizado no cromossomo 9p21, é muito provável que deleções ocorridas nessas regiões cromossômicas acarretem transformações malignas (MAO et al., 1996; SABBAGA, 2000).

A reativação da telomerase, prolongando o tempo de vida da célula e possibilitando o acúmulo de múltiplas alterações genéticas parece ser um processo

importante na etapa inicial da carcinogênese de cabeça e pescoço (CALIFANO et al., 1996). A amplificação gênica e a superexpressão protéica também parecem estar associadas. O gene da ciclina D1, por exemplo, está freqüentemente amplificado e superexpresso em estágios precoces da carcinogênese de cabeça e pescoço (IZZIO et al., 2003). A expressão aberrante da ciclina D1 também está relacionada à deleção do *p16* (UZAWA et al., 2007). O receptor de EGF (EGFR), geralmente superexpresso, também tem sido considerado como potencial alvo de intervenção terapêutica em carcinomas de cabeça e pescoço (POMERANTZ; GRANDIS, 2003).

Muitos genes já foram associados ao câncer de boca, incluindo oncogenes *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* E *N-RAS*), *MYC*, *C-ERBB*, *ERBB-2* e alguns localizados no braço longo do cromossomo 11, tais como *BCL-1*, *PRAD-1*, *INT-2*, *HST-1*, *EMS1* (DAS; MAJUMDER; DASGUPTA, 2000; SABBAGA, 2000). Outros potenciais marcadores são as caderinas-E (SIMIONESCU et al., 2008) e *PTEN* (SQUARIZE; CASTILHO; PINTO JR, 2002). O clássico supressor tumoral *TP53* geralmente está mutado em 50% dos casos (BRENNAN et al., 1995), porém a interpretação definitiva de todos esses achados ainda é ponto de debate na literatura.

Arora et al. (2005) identificaram vários genes diferencialmente expressos em carcinoma epidermóide bucal, incluindo componentes do sistema imune, sinalização e estrutura celular, angiogênese, proliferação, apoptose, adesão e metabolismo celular. Mais recentemente foi relatado que a ativação da via do *AKT*, correlacionada à expressão de caderina-E, representa um importante indicador prognóstico para o carcinoma epidermóide bucal, de forma que sua inibição seria uma possível abordagem terapêutica para essas lesões (LIM et al., 2005).

Atualmente, há uma tendência progressiva em associar genes responsáveis pelo desenvolvimento com a gênese de neoplasias malignas, em função de ambos os processos compartilharem mecanismos envolvidos na proliferação e diferenciação da célula, como ciclo celular e apoptose. Nesse contexto, destacam-se os genes da família dos *homeobox*, que são importantes para o desenvolvimento embrionário quando atuam, por exemplo, na morfogênese e diferenciação celulares, codificando proteínas que regulam o processo de transcrição. Como a expressão anormal de genes que controlam o crescimento e o desenvolvimento está implicada na carcinogênese, admite-se a possibilidade de os genes *homeobox* estarem desregulados no câncer.

2.1.2.1 Ferramentas de biologia molecular na análise da expressão gênica

Embora alterações gênicas tenham sido descritas para o carcinoma epidermóide bucal, a adequada compreensão dos fenômenos celulares e moleculares presentes permanece limitada. Portanto, uma varredura eficiente das alterações moleculares encontradas em carcinomas epidermóides bucais, obtido por meio de ferramentas de larga escala como análises de microarranjo de DNA (*microarray*), e qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa), pode revelar biomarcadores com elevada sensibilidade e especificidade clínicas (GINOS et al., 2004).

A tecnologia de *microarray* permite identificar o nível de expressão de milhares de genes em determinada amostra através de uma única reação de hibridização.

Para isso, um grupo de sondas, representadas por fragmentos de DNA, é imobilizado e distribuído de forma organizada e documentada sobre um suporte sólido, e se hibridizará com o alvo de interesse, representado pelo cDNA marcado em solução. O sinal da intensidade para cada sonda se correlacionará, então, com a abundância do RNA mensageiro (mRNA) complementar à sonda em particular. A partir dos resultados obtidos, aqueles genes com expressão alterada nos tecidos tumorais poderão ser futuramente utilizados como marcadores específicos para cada tipo tumoral, bem como para uso como alvos terapêuticos ou no desenvolvimento de vacinas (SOMOZA-MARTÍN et al., 2005; BRENTANI et al., 2005). No entanto, embora esta ferramenta seja extremamente abrangente e eficaz na identificação de uma grande quantidade de genes, este não é o ponto crítico a ser desvendado, mas sim a informação quantitativa associada com um dado perfil de expressão (BRENTANI et al., 2005). Sendo assim, a expressão dos genes identificados por *microarray* deve ser validada com metodologias complementares, como a RT-PCR convencional, ou ainda, em tempo real (qRT-PCR), possibilitando a quantificação dessa expressão.

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. O método utiliza um sistema fluorescente capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação. Para isso, os sistemas de detecção da PCR em tempo real utilizam moléculas que absorvem e emitem luz em um comprimento de onda específico, proporcionando o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. Nessa reação, pode-se utilizar o *SYBR® Green*, que se liga entre a dupla fita de DNA e emite uma fluorescência de

cor verde sob excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador. Inicialmente, a mistura da reação contém o DNA (genômico ou complementar) desnaturado, os iniciadores (*primers*) e o *SYBR® Green*, sendo que as moléculas não ligadas do fluoróforo apresentam fluorescência fraca que resultam em um sinal mínimo que pode ser subtraído durante a análise de computador.

Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do *SYBR® Green* se ligam, gradativamente, ao DNA recentemente sintetizado. Na etapa seguinte de desnaturação do DNA, as moléculas do *SYBR® Green* são liberadas e há queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Em resumo, enquanto o elevado rendimento da análise por microarranjo constitui a ferramenta que permite uma análise em larga escala de padrões de expressão, a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase representa a ferramenta que proporciona a sensibilidade necessária para se validar os resultados para genes individuais (BUSTIN; NOLAN, 2004).

2.2 Fisiologia dos genes *homeobox*

Os genes *homeobox* são conhecidos como genes controladores do desenvolvimento e importantes para a evolução dos organismos, pois atuam no topo de hierarquias genéticas regulando aspectos essenciais da embriogênese, morfogênese e diferenciação celular de uma série de organismos dos mais simples aos mais complexos. Esses genes são assim chamados por possuírem um

segmento de DNA característico (*homeobox*) constituído de 180 pares de base (pb) e que codifica um homeodomínio de 60 aminoácidos (aa) altamente conservado durante a evolução. As proteínas com este homeodomínio funcionam como fatores de transcrição através da ligação do mesmo com o DNA de maneira seqüência-específica (Figura 2.1), interagindo com genes-alvo e promovendo sua possível ativação, repressão ou mesmo modulação, o que está na dependência do sinal recebido pela célula (ABATE-SHEN, 2002; MARK; RIJLI; CHAMBON, 1997; NUNES et al., 2003).

Figura 2.1 – Estrutura hélice-giro-hélice do homeodomínio, mostrando a região da terceira hélice interagindo no sulco maior do DNA de maneira seqüência-específica.

Fonte: Abate-Shen (2002).

O conhecimento a respeito dos genes-alvo das homeoproteínas codificadas pelos genes *homeobox* é escasso. Sugere-se que entre os genes-alvo controlados pelos produtos gênicos dos *homeobox* estão moléculas de adesão, fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular e outros fatores de transcrição (JONES et al., 1992; GUAZZI et al., 1994; CARE et al., 1996; RAMAN et al., 2000; BOUDREAU; VARNER, 2004).

A descoberta dos genes *homeobox* forneceu uma ferramenta importante para o entendimento do desenvolvimento embrionário e evolução das espécies, já que

foram encontrados com função semelhante em várias espécies, de fungos e vegetais a humanos (GEHRING, 1998). Os genes *homeobox* foram descobertos na *Drosophila melanogaster* como genes homeóticos, responsáveis pela segmentação ântero-posterior nas fases iniciais da embriogênese, contribuindo fortemente para a correta localização de suas estruturas corporais (DE ROBERTIS; OLIVER; WRIGHT, 1990; GEHRING, 1998). Essa descoberta foi possível a partir do fenômeno de homeose, causado por mutações nesses genes, quando ocorre transformação de uma estrutura corporal em outra. Um exemplo típico ocorre quando da mutação do gene *Antennapedia*, que acarreta a formação de patas no lugar de antenas.

Sabe-se que nos vertebrados os genes homólogos ao complexo homeótico da *Drosophila* (HOM-C) estão dispostos de maneira agrupada e são chamados de genes *homeobox* agrupados (*HOX*). Em humanos estão representados por 39 membros dispostos em quatro grupos (A, B, C e D) contendo de 9 a 11 genes em cada um deles, sendo localizados, respectivamente, nos cromossomos 7, 17, 12 e 2. Durante a morfogênese embrionária, os genes *HOX* determinam a identidade posicional ao longo dos eixos corporais dos animais, expressando-se da região dos arcos branquiais à cauda. Esse processo ocorre obedecendo a uma ordem de colinearidade espacial e temporal, com os genes *HOX* da região 3', como o *HOXA1* e *HOXD1* sendo expressos precocemente e na região anterior, seguidos progressivamente pelos genes da região 5', como o *HOXA13* e *HOXD13*, que são expressos mais tardiamente e em regiões mais posteriores do embrião (Figura 2.2) (AWGULEWITSCH, 2003; CILLO et al., 1999; GOODMAN, 2002).

Figura 2.2 – Conservação das famílias de genes *Hom-C* e *HOX*. Os quatro grupamentos *HOX* (A, B, C e D) localizados nos cromossomos indicados à direita mostram o alinhamento paralelo, revelando a existência de 13 grupos parálogos cujos membros estão representados pelas caixas de mesma cor.

Fonte: GRIER et al. (2005).

2.3 Genes *homeobox* e oncogênese

A oncogênese tem sido relacionada por vários estudos com o desenvolvimento embrionário, já que ambos os processos são dependentes, de forma diferente, da proliferação e diferenciação celulares. Enquanto na embriogênese um balanço delicado entre proliferação e diferenciação celular é essencial para o desenvolvimento normal do feto, no câncer o equilíbrio desses dois processos não existe. De acordo com Grier et al. (2005), a observação de que genes *homeobox* estão estreitamente envolvidos na embriogênese e são diferencialmente expressos em malignidades de vários tecidos gerou a idéia de que a “oncologia recaptula a ontogenia”.

Nesse aspecto, os genes de desenvolvimento embrionário, como os da família *homeobox*, aparecem como alvos interessantes de pesquisas científicas. Apesar de muitos estudos relatarem a expressão desregulada e diferencial de genes *homeobox* em diversas neoplasias malignas (ABATE-SHEN, 2002; HUNG et al., 2003; RAMAN et al., 2000), entre elas as de mama (CARRIO et al., 2005; FISHER et al., 2000; MORINI et al., 2000), endométrio (CARRIO et al., 2005), fígado (SHIMODA et al., 2006), pulmão (LECHNER et al., 2001; TIBERIO et al., 1994), tireóide (TAKAHASHI et al., 2004), esôfago (TAKAHASHI et al., 2007) e hematológicas (LA STARZA et al., 2003; PANAGOPOULOS et al., 2003, TAKETANI et al., 2002a, 2002b), linfoma (NAGAI et al., 1999; NAGAI et al., 2003), melanoma (FURUTA et al., 2006), mais recentemente, em carcinoma epidermóide de boca (ZHU et al., 2004; HASSAN et al., 2006), existe uma dificuldade em se definir as vias de sinalização das quais estes genes efetivamente participam durante a carcinogênese. De maneira geral, as

conseqüências dos genes *homeobox* para o processo de carcinogênese podem ser interpretadas como uma extensão de sua função normal (ABATE-SHEN, 2002).

Além das funções específicas já conhecidas dos genes *homeobox* na embriogênese, estes genes também são expressos em alguns órgãos humanos adultos normais em padrões característicos, sugerindo seu papel potencial na manutenção da arquitetura tecido-específica (TAKAHASHI et al., 2004; VAN OOSTVEEN et al., 1999; YAHAGI et al., 2004). A participação de genes *homeobox* em algumas neoplasias é mais encontrada na literatura associada com os genes *HOX*, ou seja, com os genes *homeobox* agrupados, apesar de alguns membros da família de genes não agrupados terem uma associação com a carcinogênese efetivamente mais consistente.

Em muitas formas de neoplasias, as translocações cromossômicas levam à formação de genes fusionados e a expressão induzida de proto-oncogenes. Os produtos da fusão freqüentemente envolvem reguladores transcricionais que agem como reguladores principais do destino celular. Em leucemia, níveis elevados de genes *HOX* são freqüentemente observados, particularmente em leucemia mielóide aguda (GOLUB et al., 1999; KAWAGOE et al., 1999; LAWRENCE et al., 1999). Alterações na expressão de genes *HOX* estão associadas com translocações cromossômicas envolvendo reguladores à montante (*upstream*) como o gene da linhagem leucêmica mista (*MLL*) ou, mais diretamente, a fusão de um gene *HOX* com outro gene como o da nucleoporina (*NUP98*). Estudos recentes sobre a expressão gênica de genes *HOX* em leucemia tem fornecido informações importantes em relação à classificação da doença e predição do curso clínico (GRIER et al., 2005). Vários trabalhos têm relatado a fusão do gene *NUP98* com sete genes, inclusive da família *HOX*, através de translocações 11p15, formando-se

proteínas quiméricas (LA STARZA et al., 2003; PANAGOPOULOS et al., 2003; TAKETANI et al., 2002a, 2002b). Ainda, La Starza et al. (2003) e Panagopoulos et al. (2003) descreveram a possível importância etiopatogênica da presença da translocação (11;12) entre *NUP98/HOXC13* em casos de leucemia mielóide aguda. De maneira semelhante, Taketani et al. (2002b) revelaram o gene *HOXD11* como um novo parceiro do gene *NUP98*, frequentemente envolvido nessas alterações cromossômicas, em um paciente com leucemia mielóide aguda exibindo t(2;11)(q31;p15).

O potencial oncogênico dos gene *HOX* está claramente relatado em leucemia, enquanto seu papel em outras neoplasias está sendo cada vez mais estudado. Vários relatos mostraram a expressão diferencial de genes *HOX* entre tecido normal e neoplásico, porém sua relação funcional com o fenótipo maligno permanece evasiva. Ligações entre a expressão de genes *HOX* e transformação maligna têm sido investigadas baseadas principalmente na hipótese de que genes expressos durante a embriogênese, porém não expressos em tecidos adultos, podem estar re-expressos no tecido neoplásico. Ou ainda, os pesquisadores pretendem correlacionar as alterações na expressão de genes *HOX* com alterações nos processos celulares (GRIER et al., 2005).

Alterações na expressão de genes *homeobox* têm sido identificadas em várias neoplasias sólidas e de linhagens celulares derivadas. Abate-Shen (2002) definiu três categorias de expressão desses genes em neoplasias. Na primeira, os genes *homeobox* que são normalmente ativos somente durante o desenvolvimento embrionário estariam re-expressos nas células neoplásicas. Para os genes *HOX*, o ganho de expressão resultante já foi encontrado em vários tumores primários e linhagens celulares como cérebro, glândula mamária e rim, nos quais os genes *HOX*

foram expressos durante a embriogênese. Esta categoria inclui a maioria dos casos de expressão aberrante de genes *HOX*. Na segunda categoria, os genes *homeobox* podem estar expressos em células malignas derivadas de tecidos em que um gene particular não é expresso durante a embriogênese. Um dos poucos exemplos conhecidos desta “nova” atividade é a expressão de *PAX5* no meduloblastoma, porém não no cerebelo, tecido do qual é derivado. Na terceira categoria, os genes *homeobox* podem estar hipo-regulados (*down-regulated*) em células malignas derivadas de tecidos nos quais um gene particular é normalmente expresso no estado totalmente diferenciado. A perda de expressão dos genes *CDX2* e *NKX3.1* em câncer de cólon são exemplos de genes *homeobox* hipo-regulados desta forma (GRIER et al., 2005).

A transformação neoplásica e sua manutenção requerem uma alteração do estado normal da célula para uma célula que prolifera de maneira anormal, não se diferencia apropriadamente e apresenta uma resposta “cega” à morte. A perda de propriedades de adesão pode resultar em invasão e, conseqüentemente, na doença metastática. Os genes *HOX* parecem exercer função sobre o estado basal da célula, então, não surpreendentemente, alterações na sua expressão têm sido identificadas em alguns processos pelos quais os tecidos malignos e normais diferem (GRIER et al., 2005).

Zhang et al. (2003) observaram um aumento da proliferação dependente de ancoragem, diminuição da resposta apoptótica ao quimioterápico doxorrubicina e aumento do potencial metastático em células neoplásicas de mama por meio da mediação, pelo menos em parte, do gene *HOXA1*. Vários genes *homeobox* não agrupados também estão envolvidos na diferenciação celular terminal, como o *MSX*, cuja expressão encontra-se geralmente confinada às células proliferativas e

indiferenciadas durante a embriogênese, e sua expressão induzida inibe a diferenciação de muitos tipos celulares como mioblastos (SONG; WANG; SASSOON, 1992), fibroblastos (WOLOSHIN et al., 1995) e osteoblastos (DODIG et al., 1999). De maneira semelhante, a super-expressão de alguns genes *HOX* está associada com perda de diferenciação, como no caso do gene *HOXC8*, cuja super-expressão em câncer de próstata está associada com perda da diferenciação da neoplasia, sugerindo seu envolvimento na aquisição de características invasivas e metastáticas (WALTREGNY et al., 2002). A relação da expressão de genes *HOX* com apoptose foi sugerida por Raman et al. (2000) quando os autores observaram diminuição dos níveis de mRNA de *P53* em grande proporção de tumores de mama, e uma perda coordenada de *p53* e mRNA de *HOXA5* bem como de sua expressão protéica em tumores e linhagens de câncer de mama. Além disso, a maioria dos espécimes tumorais negativos para *p53* apresentava metilação da região promotora do gene *HOXA5*, levando os autores a concluir que a perda de expressão de *HOXA5* pode ser primariamente responsável pela perda de expressão de *p53*.

A expressão de genes *HOXC* (*HOXC10*, *HOXC11* e *HOXC13*) parece estar inversamente relacionada com a expressão de moléculas de superfície envolvidas nas interações célula-célula e célula-matriz e, como se espera que células com baixa expressão dessas moléculas tenham um maior potencial metastático, os genes *HOX* também parecem estar envolvidos no processo de metástase (CILLO et al., 1996). Além disso, os genes *HOX*, em especial dos grupos *HOXB* e *HOXD*, parecem promover a angiogênese em suas fases iniciais e tardias, o que é essencial para o crescimento de tumores sólidos, e pode representar futuros alvos terapêuticos (BOUDREAU et al., 1997; CARE et al., 2001; GORSKI; WALSH, 2000; MYERS; CHARBONEAU; BOUDREAU, 2000; WU et al., 2003).

A família de genes *PAX* representa, dentro dos homeobox, aquela cuja associação com o câncer está mais bem estabelecida. Essa família possui nove genes todos expressos no sistema nervoso central, mesoderma paraxial e seus derivados. Esses genes apresentam um domínio comum de ligação ao DNA, o *paired box* (CILLO et al., 1999), no entanto nem todos os seus membros são da família *homeobox*, já que alguns deles não possuem a região do homeodomínio em suas proteínas. Maulbecker e Gruss (1993) estudaram o potencial oncogênico de genes *Pax*, demonstrando que esses genes eram capazes de induzir oncogênese em camundongos ao atuarem como proto-oncogenes. Essa indução era dependente do domínio *paired* funcional e não necessitava da presença do homeodomínio para essa atuação. Dessa forma, não somente as proteínas Pax3 e Pax6, que além de possuírem o domínio *paired*, possuem também homeodomínio, como também Pax2 e Pax8 que contém apenas homeodomínios residuais e o Pax1, que não possui homeodomínio, foram capazes de induzir tumorigênese em camundongos. Além disso, é relatado que rabdomiossarcomas alveolares geralmente apresentam translocações cromossômicas envolvendo os genes *PAX* e *FKHR* (*forkhead gene*) de maneira que a fusão *PAX7-FKHR* (10-20% dos casos) está relacionada a um prognóstico mais favorável em comparação a translocação mais comum *PAX3-FKHR* (60-70% dos casos) (SORENSEN et al., 2002).

O gene não agrupado *PROX1* parece estar freqüentemente inativado em carcinomas do sistema biliar por meio de deleções genômicas e silenciamento epigenético (LAERM et al., 2007). Para tumores primários de pulmão, transcritos do gene *PITX1* foram encontrados subexpressos quando comparados com tecidos pulmonares normais. Adicionalmente, uma associação entre a falta de expressão desse gene e um maior grau de diferenciação foi observada (CHEN et al., 2007).

O estudo de Gidekel et al. (2003) evidencia um gene *homeobox* normalmente importante para diferenciação de um tecido específico tendo papel causal na carcinogênese desse mesmo tecido se expresso no tempo, nos níveis e no contexto errado. Nesse estudo, os autores mostraram que *OCT-4* (também conhecido como *OCT-3* e *POU5f1*), um membro não agrupado da família dos *homeobox*, está expresso em vários tumores do testículo, incluindo carcinomas embrionários, seminomas, tumores de células germinativas mistas e neoplasias de células germinativas intratubulares. Em condições normais, *OCT-4* é restrito a células germinativas e é necessário para sua pluripotencialidade, porém pode causar tumores testiculares caso sua expressão seja reativada nessas mesmas células que já sofreram maturação.

Em relação a órgãos não sólidos, homeoproteínas do gene *MSX* e a cascata de sinalização Ras já foram associadas a leucemias (TAKAHASHI et al., 1997). De maneira geral, os trabalhos sobre *homeobox* não agrupados estão associados a anormalidades e síndromes diversas (QIU et al., 1996; WUYTS et al., 2000).

Foi proposto que fatores de crescimento representam alvos normais da ativação de genes *HOX* durante a embriogênese. Exemplo típico ocorre em melanomas, onde a hiper-expressão do *HOXB7* ativa constitutivamente o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), favorecendo a proliferação celular descontrolada (CARÉ et al., 1996). O gene *HOXB7* mostrou-se também expresso em câncer de mama e nesse caso foi associado com mau prognóstico (HYNDMAN et al., 2002). Mais recentemente o *HOXB7* foi relacionado ao reparo de DNA tanto *in vitro* quanto *in vivo*, representando o primeiro gene *HOX* na literatura relacionado com esse tipo de função (RUBIN et al., 2007).

Chang et al. (1998) estudaram a amplificação de transcritos de genes *Hox*, tanto na pele normal de camundongos adultos como em papilomas e carcinomas, através do uso de iniciadores degenerados. Seus resultados mostraram que 25 dos 39 genes *Hox* conhecidos foram amplificados no tecido normal. Ao contrário, nos papilomas e carcinomas, houve isolamento preferencial de clones do *HoxA7* e *HoxB7* com concomitante silenciamento de todo o lócus do grupo *HoxD*, sugerindo que a maioria dos membros do grupo *Hox* estão expressos na pele normal de camundongos, enquanto seu repertório é substancialmente limitado em papilomas e carcinomas.

Rieger et al. (1994) observaram que a expressão do gene *HOXC4* em queratinócitos de pele normal e em tumores de pele estava correlacionada com a diferenciação celular. Utilizando RT-PCR e hibridização *in situ*, os autores encontraram expressão predominante do gene em queratinócitos diferenciados, ao passo que em células mais indiferenciadas o gene mostrava-se com baixa expressão.

Takahashi et al. (2004), através da comparação de tecidos tireoidianos normais e linhagens celulares de câncer de tireóide mostraram alteração na expressão de alguns genes *HOX* de maneira órgão-específica, especialmente para aqueles da família Abd-B, que se mostraram mais desregulados nesse tipo de neoplasia que os outros genes *HOX*. Um recente estudo em carcinoma de esôfago mostrou níveis de expressão significativamente elevados em 24 dos 39 genes *HOX* e nos genes *CDX1*, *CDX2* e *PDX1* em comparação a mucosa normal. Além disso, reações imuno-histoquímicas mostram que as proteínas *HOXA5* e *D9* estavam mais presentes no citoplasma dessas lesões do que em mucosa normal (TAKAHASHI et al., 2007).

2.3.1 Genes *homeobox* em carcinoma epidermóide de boca

Na literatura existem apenas dois artigos científicos recentemente publicados relacionando genes *homeobox* e carcinogênese de boca. Um deles, realizado por Zhu et al. (2004), avaliou a expressão de transcritos do gene *homeobox QUOX-1* e sua respectiva proteína em mucosa normal, epitélio displásico e lesões de carcinoma epidermóide de boca. Os resultados obtidos nesse estudo revelaram que o *QUOX-1* não estava expresso em epitélio normal, porém sua positividade aumentava progressivamente durante a progressão da displasia. Além disso, sua expressão não foi significativamente diferente em displasia avançada e carcinoma epidermóide de boca altamente diferenciado, mas à medida que ocorria uma redução da diferenciação, havia um aumento da expressão do *QUOX-1*.

O outro estudo, realizado por Hassam et al. (2006), analisou os 39 *HOX* em mucosa normal, displasia e carcinomas epidermóides de boca. Nesse estudo foram encontrados 18 genes superexpressos (*HOXA1, A2, A3, A5, A9, B3, B6, B7, B9, C4, C8, C9, C11, C13, D9, D10 e D11*) em comparação à mucosa normal. O gene *HOXA2, A3, B3 e D10* também estavam superexpressos nas lesões displásicas da boca em relação à mucosa normal, porém nenhuma diferença foi observada entre as displasias e o carcinoma epidermóide de boca, enquanto *HOXA1, B7, B9 e C8* tiveram expressão diminuída em carcinoma epidermóide de boca quando comparadas à mucosa normal.

A partir destes resultados prévios, acreditamos que o estudo da expressão dos genes *homeobox* no carcinoma epidermóide de boca utilizando-se ferramentas de biologia molecular que permitam a análise do seu perfil de expressão gênica global

deva contribuir para a identificação de genes diferencialmente expressos nesta neoplasia, propiciando indícios significativos para a compreensão dos mecanismos moleculares a cerca da carcinogênese bucal. Nesse aspecto, o Laboratório de Patologia Molecular da FOUSP participa atualmente do Projeto Temático “Busca de marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço” (FAPESP 04/12054-9), sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Eloiza Helena Tajara da Silva, que envolve cerca de 80 pesquisadores de nove Instituições diferentes em quatro cidades do Estado de São Paulo (Ribeirão Preto, São José dos Campos, São José do Rio Preto, São Paulo) responsáveis pela coleta e armazenamento dos dados clínicos, coleta e processamento do material biológico, bem como realização de experimentos de microarranjo, expressão gênica, polimorfismos e proteômica. Como subprojeto deste Projeto Temático e inserido na categoria de Projeto Regular/Auxílio à Pesquisa fomentado pela FAPESP (06/04736-8), o presente trabalho utilizou os dados gerados por um *microarray* contendo 55.000 genes, analisando a expressão de aproximadamente 200 genes *homeobox*, incluindo-se variantes de *splicing* alternativo.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Identificar os genes *homeobox* hiper-expressos em carcinomas epidermóides de boca, validar os achados por qRT-PCR verificando as diferenças na expressão desses genes *homeobox* entre grupos de carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal, e suas margens não tumorais correspondentes, e relacionando esses achados com alguns critérios clínicos de agressividade tumoral.

Objetivos Específicos

1. Analisar transcritos de genes *homeobox* obtidos de amostras de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, quanto à hiper-expressão em um *microarray* com 55000 genes.

2. Selecionar um grupo de genes *homeobox* identificados na análise dos dados do *microarray* como hiper-expressos nas neoplasias mais e menos agressivas, em relação ao *pool* de amostras não tumorais correspondentes, validando esses dados por qRT-PCR em um número maior de amostras de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho de boca.

3. Relacionar a expressão dos genes *homeobox* selecionados com os critérios clínicos de agressividade, com aspectos clínicos e histopatológicos, e com a sobrevida dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras biológicas

Os critérios definidos para seleção dos casos utilizados no presente estudo incluem amostras de carcinoma epidermóide de boca, com diagnóstico confirmado após exame anátomo-patológico da peça cirúrgica, de pacientes tabagistas com idade igual ou superior a 40 anos, de ambos os sexos, com lesões intra-orais restritas a outras partes e de partes não especificadas da língua (C02) bem como de assoalho bucal (C04), e que representassem o sítio primário da lesão. As amostras foram separadas em dois grupos definidos, como 1) grupo de tumores mais agressivos: T1/T2, N+, e 2) grupo de tumores menos agressivos: T3/T4, N0, sem evidências de metástase ou infiltração. Foram excluídas amostras com RNA considerado de baixa qualidade após extração ou que não tiveram amplificado algum gene constitutivo (*ACTB* e/ou *HPRT*).

As amostras coletadas foram armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer a -80°C, permanecendo nesta condição até a posterior microdissecção e extração do RNA total.

Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido referente a cada Instituição de origem (Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Hospital Heliópolis), tendo sido previamente submetidos e aprovados pelo CONEP (parecer nº 1763/2005). Especificamente este trabalho foi também

autorizado pelo Comitê de Ética da FOU SP (protocolo nº 196/06) (Anexos A e B, respectivamente).

4.2 Dados dos pacientes

Os dados clínicos e histopatológicos referentes a cada paciente foram obtidos a partir do sistema eletrônico *on line* do Projeto Temático GENCAPO (Genoma Clínico de Cabeça e Pescoço; <http://ctc.fmrp.usp.br/clinicalgenomics/cp/>; FAPESP 01/13717-3) sob responsabilidade de Victor Wünsch Filho, coordenador da Equipe de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Os dados clínicos obtidos incluíram idade (grupo de 40-65 anos e grupo acima de 65 anos), sexo e história de consumo de álcool e tabaco. Os dados da peça cirúrgica incluíram localização e tamanho da lesão (pT), comprometimento linfonodal (pN), estadiamento patológico (pTNM), diferenciação histológica (dif. histol.), infiltrado inflamatório (II), e infiltrações perineural (IP), vascular sanguínea (IS) e vascular linfática (IL).

4.3 Obtenção do RNA total

As amostras de tecidos congelados foram previamente emblocadas em *Tissue Teck* e coradas com azul de toluidina para confirmação histopatológica e microdissecção manual, a fim de se eliminar contaminantes teciduais tais como glândula salivar, tecidos muscular e adiposo. Dessa forma, selecionou-se apenas o tecido tumoral de interesse, representado em média por 70-80% do espécime remanescente, bem como o tecido epitelial morfológicamente livre de tumor das margens. Posteriormente, as amostras tumorais e não tumorais microdissecadas foram submetidas à extração de RNA total utilizando-se solução de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), seguindo-se os protocolos otimizados nos laboratórios da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto e do Hemocentro da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto.

A pureza do RNA extraído foi verificada através de leitura em espectrofotômetro NanoDrop™ cuja razão OD 260 e 280 variou entre 1,3 e 1,9. A qualidade do RNA foi avaliada através de géis de agarose 2%, sendo considerada ótima quando as bandas 28S e 18S de rRNA estavam nítidas e intensas, numa razão de 2:1. Em seguida, as amostras de RNA com qualidade considerada satisfatória ou boa foram tratadas com DNase (Promega).

4.4 Estudo da expressão gênica global por *microarray*

A partir dos resultados sobre a qualidade e concentração do RNA total obtido, foram selecionados os casos com RNA de qualidade satisfatória para os experimentos de microarranjos. No total, foram hibridizadas 12 lâminas e os chips eram compostos por oligonucleotídeos correspondentes a 55.000 transcritos distintos de genes humanos, incluindo 112 genes homeobox e variantes de *splicing* alternativo, com seqüências catalogadas em banco de dados (*Human Unigene*, NCBI). Os *chips* utilizados consistiram de lâminas de vidro cobertas com um polímero de acrilamida contendo grupamentos do tipo éster, ligados covalentemente a oligonucleotídeos (30mers) por intermédio de adaptadores hexil-amino presentes na extremidade funcional 5'. Esta química de adesão garante a incorporação exclusiva de oligonucleotídeos funcionais com seqüência completa, aumentando a especificidade do sistema, além de proporcionar relativa flexibilidade conformacional, que favorece a acessibilidade dos oligonucleotídeos e sua capacidade de interação com moléculas-alvo, gerando sinais fluorescentes de hibridização mais intensos.

A plataforma escolhida utiliza um sistema de detecção de cor única, baseado na incorporação indireta de apenas um fluorocromo para marcação das amostras, que elimina resultados falsos decorrentes de parâmetros enzimáticos que afetam a frequência de incorporação de fluorocromos distintos ou relativos à sobreposição espectral de duas fluorescências. Estudos de validação de *CodeLink™ Bioarray Chips* (SENDERA et al., 2002) indicam alta reprodutibilidade (coeficiente de variação médio de 10% entre diferentes hibridizações), sensibilidade (detecção de uma cópia por célula) e especificidade (capaz de distinguir seqüências com até 93% de

similaridade), favorecendo seu emprego na caracterização molecular de diversos tipos de câncer.

Os experimentos utilizaram 5 µg de RNA total extraído de cada amostra de carcinoma epidermóide de língua ou de assoalho bucal, bem como de tecido não tumoral adjacente. Os procedimentos para hibridização e detecção seguiram as indicações da *GE Health Care*, que preconiza a utilização de RNAs complementares (cRNA) marcados com uridina biotinilada, preparados por transcrição reversa seguida de síntese de cDNA dupla fita e transcrição *in vitro*, fragmentados e hibridizados com os oligonucleotídeos (em duplicata) presentes nos *chips*, a 37°C, por 18h. Após sucessivas lavagens, fragmentos de cRNA especificamente aderidos foram marcados com fluorocromo (cyanine 5) conjugado à streptavidina, sendo a intensidade fluorescente captada por um *Axon GenePix 4000B Scanner* (Axon Instruments). Os dados de expressão extraídos de cada microarranjo foram normalizados de acordo com os valores de expressão dos genes de expressão constitutiva presentes nos *chips* como controles internos. Os genes diferencialmente expressos nos tecidos tumorais foram identificados pelas razões dos valores da intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras teste e controle, pelo programa *CodeLink Expression v.2.4* (GE Health Care). Os critérios para definição de valores de corte para identificar genes diferencialmente expressos foram baseados em parâmetros biológicos (ex: razões ≥ 2 ou $\leq 0,5$) e estatísticos (ex: $p < 0,01$, *Student's T test*). A reprodutibilidade dos resultados e a porcentagem de falso-positivos foram determinadas por Análise de Variância e coeficiente de correlação de Pearson.

Dados de diferentes microarranjos foram analisados paralelamente, e padrões de expressão gênica global foram identificados pelo agrupamento de genes em *clusters*, através do programa *Vector Xpression* (Informax). A formação de *clusters*

hierárquicos foi baseada no algoritmo de *average-linkage*, utilizando-se coeficiente de correlação ou distância Euclidiana como matriz (EISEN et al., 1998). Uma abordagem não supervisionada (TEFFERI et al., 2002) foi utilizada nos estudos focados no prognóstico e na classificação de tumores.

Esta etapa experimental foi integralmente realizada no Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (IIEP) juntamente com a pesquisadora Dra. Patrícia Severino sob orientação do pesquisador Dr. Oswaldo Keith Okamoto, também responsável pela análise dos dados gerados pelo *microarray*.

4.5 Confeção do cDNA por meio de transcrição reversa do RNA

Foi selecionado um total de 56 amostras originadas de 30 pacientes para a validação por qRT-PCR dos achados de *microarray*, correspondendo a 16 pacientes portadores de tumores menos agressivos e 14 portadores de tumores mais agressivos. As amostras apresentaram-se pareadas em tumor e margem correspondente na sua totalidade para os casos menos agressivos, e em sua maioria para os casos mais agressivos (10 amostras de margens de tumores mais agressivos). Para o gene *HOXC13* foi utilizado um número menor de amostras tumorais, correspondendo a seis amostras de tumores mais agressivos e 11 de tumores menos agressivos, devido à disponibilidade do reagente iniciador da reação de qRT-PCR.

O DNA complementar (cDNA) utilizado nas reações de qRT-PCR foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa utilizando-se *High Capacity cDNA*

Archive kit (Applied Biosystems), em um volume final de reação de 50 µL partindo-se de 1,0 µg de RNA total. Para a síntese do cDNA, os tubos com as amostras foram colocados em termociclador (Mastercycler, Eppendorf) e submetidos a 25°C por 10 min seguido de um período de incubação de 120 min a 37°C.

Todas as reações de transcrição reversa foram realizadas no Laboratório do Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

4.6 Análise quantitativa da expressão gênica por qRT-PCR

Os genes *homeobox* diferencialmente expressos selecionados pelos experimentos com microarranjos de cDNA foram avaliados por qRT-PCR, gerando dados quantitativos. A expressão de cada gene-alvo foi comparada entre amostras tumoral e controle (não tumoral), bem como tumoral (mais e menos agressivo) entre si, a partir da utilização do gene de expressão constitutiva *HPRT*, para controle de normalização de massa.

O protocolo utilizado para a realização do presente trabalho descreve o procedimento experimental detalhado para qPCR utilizando-se o fluoróforo SYBR® Green I (SYBR Green Master Mix®, Applied Biosystems). Os *primers* foram desenhados utilizando-se o programa GeneTool 2.0 (Biotools, Alberta, Canadá), de forma que essas seqüências estivessem presentes em exons diferentes, apresentassem uma temperatura de associação entre 58 e 62°C e gerassem produtos de tamanho idealmente entre 100 e 200pb (Tabela 4.1). Para as reações

de amplificação dos membros da família *HOX*, optou-se pela aquisição de oligonucleotídeos comercializados pela SuperArray Biosciences™ (*HOXC13* cat nº PPH11411A, *HOXD10* cat nº PPH11616A e *HOXD11* cat nº PPH19882A) e já citados na literatura (GALLIGAN et al., 2007).

Tabela 4.1 - Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação por qRT-PCR segundo o gene-alvo, número de acesso no *Gene Bank*, a orientação e o tamanho do produto

GENE	<i>Gene Bank</i>	INICIADORES (5'3')		TAMANHO DO PRODUTO (pb)
		SENDO	ANTI-SENDO	
<i>IRX4</i>	NM_016358.2	gcgcccgcctgtctac	agaccggcgctgggcc	152
<i>PROX1</i>	NM_002763.3	ctccgtggaactcagcgc	gccggcttaagagggtg	145
<i>ZHX1</i>	NM_007222.3	ctgctgcttgacctgttg	gcagctttctcatggtgcaa	198
<i>HPRT1</i>	NM_000194.2	ttctttgctgacctgctgg	tcccctgttgactggtcat	119

Os produtos da RT serviram de molde para a amplificação por qRT-PCR, sendo todas as reações realizadas em um volume final de 25 µL em tubos óticos com os seguintes reagentes: *primer pair mix* (10 pmol/µL de cada *primer sense* e *anti-sense* para cada alvo), SYBR® Green Mix (2x), cDNA (2 µL na diluição de 1:5) e água. O processo de ciclagem térmica constituiu-se de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos constituídos por desnaturação a 95°C por 15 segundos e associação/extensão a 60°C por 1 minuto. Somente para o gene *HOXD10* a temperatura de associação foi otimizada para 61°C, também por 1 minuto. Após o término do último ciclo, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, conferindo-se a ausência de qualquer curva bimodal ou sinal anormal de amplificação. Para cada par de *primers* foi realizada PCR em tempo real em água estéril (*blank*) para avaliação de sua possível contaminação.

Para a quantificação relativa dos genes *homeobox* estudados no presente trabalho, todas as amostras experimentais foram amplificadas em duplicata e a quantidade normalizada do gene-alvo foi determinada através da curva-padrão, obtida a partir de diluições seriadas de cDNA de linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço (CARDINALI et al., 1995), também amplificadas em duplicata a cada reação. Para fins de quantificação, foram consideradas apenas amostras com pico de dissociação específico.

4.7 Análise estatística dos resultados

A caracterização da amostra foi feita por meio de média, desvio-padrão, valores mínimos e máximos, e porcentagem.

Inicialmente, a expressão dos transcritos dos genes *homeobox* foi comparada estatisticamente entre amostras de tumor e margem de maneira geral, assim como conforme agressividade tumoral. Para a análise entre os dois grupos definidos como tumor e margem, sem considerar agressividade, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney, que compara uma variável quantitativa em duas amostras independentes. Para a análise de quatro grupos definidos como tumores mais e menos agressivos e suas respectivas margens, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando foi detectada diferença estatisticamente significativa, procedeu-se o teste de comparações múltiplas baseado na estatística de Kruskal-Wallis, para se identificar quais as categorias que diferiram entre si. Para este fim, o teste não utiliza os valores numéricos diretamente, mas sim os postos que eles ocupam em uma série de dados ordenados por valores crescentes, reunindo em um

só conjunto os dados de todas as amostras que serão comparadas. Para a análise dos resultados do presente trabalho foram utilizados métodos estatísticos não-paramétricos, pois a expressão não apresentou distribuição normal, devido à grande dispersão dos dados.

Em um segundo momento, visando discriminar os tumores das margens e responder ao objetivo principal do trabalho que foi verificar a possível utilização de algum gene *homeobox* ou de um conjunto deles como marcador(es) de agressividade em carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, foi feita a análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*; METZ, 1978; ZWEIG; CAMPBELL, 1993). Esta curva é utilizada para avaliar o desempenho diagnóstico de um teste ou a sua precisão para discriminar casos normais de doentes. A análise é realizada por meio de um método gráfico simples e robusto que permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte. A probabilidade de um teste diagnóstico produzir um resultado positivo, dado que o indivíduo é portador da doença ou, no caso, que o tumor é mais agressivo, é chamada sensibilidade do teste; e a probabilidade do teste produzir um resultado negativo, dado que o indivíduo não porta a doença ou, no caso, que o tumor é menos agressivo, é chamada especificidade.

Na curva ROC, o eixo vertical é a função da fração verdadeiramente positiva (sensibilidade) e o eixo horizontal é em função da fração falsamente positiva (100-especificidade), para diferentes pontos de corte. Cada ponto da curva ROC representa o par sensibilidade/especificidade correspondente a um limiar particular. Quanto maior a área da curva, maior a precisão do teste (ZWEIG; CAMPBELL, 1993), sendo que a área abaixo da curva ROC (AUC) é um dos índices mais utilizados para verificar a “qualidade” da curva, estando associada ao poder

discriminante desse teste. Quando se obtém um valor de AUC igual a 0,5 considera-se uma performance ao acaso, enquanto um valor próximo de 1,0 indica uma predição quase perfeita.

A fim de verificar se existiu associação entre a expressão dos genes *homeobox* e os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes foi aplicado o teste exato de Fisher, que é particularmente adequado para amostras pequenas e testa diferenças entre dois grupos independentes, em relação a uma variável qualitativa qualquer que só admita duas alternativas como resposta. Os valores de pontos de corte fornecidos pela análise da curva ROC foram utilizados como referência para transformar os valores de expressão em variáveis qualitativas. As variáveis testadas foram localização anatômica (C02 ou C04), tabagismo (até o presente ou somente no passado), etilismo (até o presente ou não/somente no passado), interação tabagismo e etilismo (ambos até o presente ou um dos dois somente no passado), agressividade tumoral (T1/T2, N+ ou T3/T4, N0), grau de diferenciação histopatológica (bem ou moderadamente diferenciado), invasão perineural (presente ou ausente) e invasão linfática (presente ou ausente).

Posteriormente, foram feitas análises univariadas de sobrevida dos pacientes utilizando-se o tempo de duração entre a data da cirurgia e a data do óbito ou do último seguimento, considerando-se o desfecho óbito relacionado à neoplasia. As curvas construídas com as estimativas das probabilidades de sobrevivência em função do tempo de observação foram elaboradas utilizando-se o estimador produto-limite de Kaplan-Meier (ARMITAGE; BERRY, 1994). Este teste é um método não paramétrico que permite a estimação das probabilidades de sobrevida das diferentes categorias de uma variável durante todo o período de acompanhamento. Foram estimadas as probabilidades de sobrevida para as variáveis sexo, idade, tabagismo

e etilismo isolados ou em associação, sítio anatômico, grau de diferenciação histopatológica, infiltração sanguínea, linfática, perineural e inflamatória, bem como tipo de tumor (mais e menos agressivo) e pontos de corte das curvas ROC dos genes *PROX1*, *ZHX1*, *HOXD10*, *HOXD11*, e *IRX4*.

Para a comparação das curvas de Kaplan-Meier utilizou-se o teste de *log-rank* (ARMITAGE; BERRY, 1994). Neste tipo de análise, para cada variável é realizado um teste de significância que indica se a variável em questão influencia ou não a resposta de interesse (óbito).

O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%, ou seja, quando o valor de p do teste estatístico é menor ou igual a 0,05 existe significância estatística.

A execução dos cálculos estatísticos foi realizada utilizando-se o software SPSS for Windows, versão 12.0, sendo a análise estatística conduzida pela Professora Titular do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Maria do Rosário Dias de Oliveira Latorre.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

A relação dos 30 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca cujas amostras foram utilizadas para os experimentos de validação por qRT-PCR, seus dados clínicos e histopatológicos, estão apresentados no anexo D. A análise das amostras referentes a esses pacientes revelou um predomínio de indivíduos do sexo masculino (93,3%, n= 28) com relação ao feminino (6,7%, n= 2). A idade média da população estudada foi de 53,1 anos (DP= 8,2 anos), observando-se uma idade mínima de 40 anos e máxima de 75 anos. Com relação ao tabagismo e etilismo, todos os pacientes eram fumantes, 76,6% (n= 23) deles até o presente e 23,4% (n= 7) somente no passado, 83,3% (n= 25) dos pacientes relataram beber até o presente, 13,3% (n= 4) somente no passado e apenas um (3,4%) relatou nunca ter consumido álcool (Tabela 5.1).

O sítio anatômico mais freqüentemente acometido foi o C04 (60%, n= 18), enquanto 40% (n= 12) dos tumores encontravam-se no sítio C02. Quanto à extensão anatômica do tumor primário, 10% (n= 3) dos pacientes apresentaram tumores classificados como pT1, 36,7% (n= 11) como pT2 e o mesmo valor para pT3, e 16,6% (n= 5) como pT4. Observou-se ausência de metástases em linfonodos cervicais em 53,3% (n= 16) dos casos (pN0), bem como níveis crescentes de comprometimento dos mesmos em 10% (n= 3; pN1), 3,3% (n= 1; pN2A), 20% (n= 6;

pN2B) e 13,3% (n=4; pN2C) dos casos. Metástases à distância (pM0) não foram observadas na amostra avaliada (Tabela 5.1).

A graduação histopatológica dos tumores mostrou que 40% (n= 12) eram bem diferenciados, 60% (n=18) moderadamente diferenciados e nenhum foi classificado como pouco diferenciado. Ainda, 53,3% (n=16) dos casos apresentavam infiltração perineural, 6,7% (n=2) infiltração vascular sanguínea e 26,7% (n= 8) infiltração vascular linfática (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Número e porcentagens de pacientes segundo consumo de álcool e tabaco, características clínicas e histopatológicas

Variável	Categoria	Número	%
Tabagismo	Sim, ainda fuma	23	76,6
	Somente no passado	7	23,4
	Nunca fumou	0	0,0
Etilismo	Sim, ainda bebe	25	83,3
	Somente no passado	4	13,3
	Nunca bebeu	1	3,4
Local	C02	12	40,0
	C04	18	60,0
T	T1	3	10,0
	T2	11	36,7
	T3	11	36,7
	T4	5	16,6
N	N0	16	53,3
	N1	3	10,0
	N2A	1	3,3
	N2B	6	20,0
	N2C	4	13,4
Grau de diferenciação	BD	12	40,0
	MD	18	60,0
Infiltração perineural	Sim	16	53,3
	Não	14	46,7
Infiltração sanguínea	Sim	2	6,7
	Não	28	93,3
Infiltração linfática	Sim	8	26,7
	Não	22	73,3
Total		30	100,0

BD= bem diferenciado, MD= moderadamente diferenciado

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos à ressecção cirúrgica como tratamento de escolha, reservando-se os tratamentos quimio e radioterápico como adjuvantes ou paliativos

5.2 Genes *homeobox* hiper-expressos na análise dos dados de *microarray*

A partir de uma análise qualitativa, as amostras que exibiram boa qualidade de RNA foram selecionadas para os experimentos de *microarray*. Entre as amostras selecionadas, quatro eram pertencentes aos grupos de tumores mais agressivos e seis amostras ao grupo menos agressivo, sendo que dois *pools* das margens correspondentes também foram utilizados, totalizando 12 lâminas de *microarray* (Tabela 5.2 e Anexo C).

Tabela 5.2 - Amostras de tumores selecionadas para experimentos em *microarrays*

Tumores +A	Tumores -A	Margens +A	Margens -A
CP1/0178	CP1/0151	CP1/0178	CP1/0151
CP2/0051	CP1/0021	CP2/0051	CP1/0021
CP2/0122	CP1/0017	CP2/0122	CP1/0017
CP2/0175	CP1/0080	CP2/0175	CP1/0080
	CP1/0031		CP1/0031
	CP3/0101		CP3/0101
4 arrays	6 arrays	1 array (pool)	1 array (pool)
Tumores +A= tumores mais agressivos, Tumores -A= tumores menos agressivos, Margens +A= margens de tumores mais agressivos, Margens -A= margens de tumores menos agressivos			

Os experimentos de hibridização seguiram os protocolos descritos pelo fabricante (GE Healthcare). As imagens foram captadas pelo *GenePix 4000B Array Scanner* (Axon Instruments) e os dados de intensidade assim obtidos foram normalizados pelo *CodeLink Software* (versão 2.3). A correção do *background* de cada *array* também foi realizada por este *software* em função dos controles internos da plataforma.

Uma análise preliminar dos dados pelo software *Codelink*, normalizados de acordo com os valores de expressão dos genes de expressão constitutiva presentes nos chips como controle interno, comparou a média simples dos resultados de cada experimento do grupo de tumores mais e menos agressivo com seus respectivos *pools* de tecido não tumoral. Os genes *homeobox* diferencialmente expressos nos tecidos tumorais foram identificados pelas razões dos valores da intensidade fluorescente obtidos a partir de amostras teste e controle, pelo programa *CodeLink Expression* (versão 2.4; GE Health Care). Os critérios para identificação de valores de corte para identificar genes diferencialmente expressos foram baseados em parâmetros biológicos (ex: razões ≥ 2 ou ≤ 0.5) e estatísticos (ex: $p < 0.01$, *Student's T test*).

Essa análise revelou um total de nove genes *homeobox* hiper-expressos nas amostras de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal (Tabela 5.3), sendo três deles (*HOXC9*, *HOXD10* e *HOXD11*) expressos tanto no subgrupo de amostras tumorais mais agressivas quanto menos agressivas. Como o principal objetivo do presente trabalho é buscar genes *homeobox* que possam funcionar como marcadores de agressividade em câncer de boca, optou-se por validar genes significativamente hiper-expressos em um ou outro subgrupo de amostras, ou seja, *HOXC13*, *ZHX1* e *IRX-4* no subgrupo de amostras de tumores mais agressivos, e

PROX-1 subgrupo de amostras de tumores menos agressivos, bem como aqueles com nível de expressão bastante significativo em geral, como o *HOXD10* e *HOXD11*.

Tabela 5.3 - Análise dos genes *homeobox* hiper-expressos em 10 amostras de tumores mais e menos agressivos, com relação ao *pool* de tecidos não tumorais correspondentes

Mais agressivos		Menos agressivos	
FLJ36749	4.0		
HOX D10	4.63	HOX D10	14,44
CDX 1	3.2		
HOX C9	4.88	HOX C9	6,4
ZHX 1	3.18		
IRX 4	9.07		
HOX C13	2.57		
HOX D11	7.27	HOX D11	90
		PROX 1	4,78

* preenchimento na cor rosa corresponde aos valores próximos ao background enquanto que na cor verde corresponde aos *homeobox* hiper-expressos em ambos os subgrupos tumorais. Em negrito, notam-se os genes selecionados para validação por qRT-PCR. *Fold-change* acima de 2 vezes entre tecido tumoral e não tumoral.

Na tabela 5.4 encontram-se as informações a respeito dos processos biológicos em que estes genes *homeobox* estão envolvidos na espécie humana, conforme consta do consórcio de banco de dados *Gene Ontology* (ASHBURNER et al., 2000).

Tabela 5.4 - Informações dos processos biológicos e funções moleculares baseados no *Gene Ontology* para os genes diferencialmente expressos revelados pela análise dos dados do *microarray*

<i>Ontologia</i>	<i>Acesso GO</i>	<i>Gene</i>
Processo biológico		
Morfogênese	GO:0009653	<i>HOXC13, PROX1</i>
Desenvolvimento de organismo multicelular	GO:0007275	<i>HOXC13, HOXD10, HOXD11, PROX1</i>
Desenvolvimento do ectoderma	GO:0007398	<i>PROX1</i>
Histogênese e organogênese	GO:0009887	<i>PROX1</i>
Desenvolvimento cardíaco	GO:0007507	<i>IRX4</i>
Desenvolvimento esquelético	GO:0001501	<i>HOXD10</i>
Determinação do destino celular	GO:0001709	<i>PROX1</i>
Regulação negativa da proliferação celular	GO:0008285	<i>PROX1</i>
Desenvolvimento de vasos linfáticos	GO:0001945	<i>PROX1</i>
Diferenciação de células endoteliais	GO:0045446	<i>PROX1</i>
Função molecular		
Iniciação/regulação da transcrição pela RNA pol II	GO:0003702	<i>HOXC13, HOXD10</i>
Atividade de fator de transcrição	GO:0003700	<i>HOXC13, HOXD10, HOXD11, IRX4, ZHX1</i>
Favorecimento da transcrição de genes específicos	GO:0003704	<i>PROX1</i>
Controle transcricional	GO:0006355	<i>HOXC13, HOXD10, HOXD11, IRX4, PROX1</i>
Inibição da transcrição	GO:0045892	<i>ZHX1</i>
Ligação protéica	GO:0005515	<i>ZHX1</i>
Ligação com íon zinco	GO:0008270	<i>ZHX1</i>
Componente celular		
núcleo	GO:0005634	<i>HOXC13, HOXD10, HOXD11, IRX4, ZHX1</i>

5.3 Expressão gênica dos *homeobox* analisada por qRT-PCR

Todas as amostras mostraram amplificação para os genes constitutivos *ACTB* e *HPRT*, este último utilizado como gene normalizador de massa. Em alguns casos, foi observado um pico secundário abaixo da temperatura de *melting* dos primers em estudo, referindo-se a dímeros de *primer*, como comprovado pelo controle negativo das reações. A mesma amostra, quando analisada em concentração maior, não apresentou este pico secundário, que pode, então, ser justificado pela pouca disponibilidade do transcrito-alvo específico. Para fins de quantificação, foram consideradas apenas amostras com pico de dissociação específico.

5.3.1 Comparação das medianas da expressão segundo tumor e margem

Ao se comparar a expressão dos genes *homeobox* em dois grupos definidos apenas como tumor e margem, sem considerar agressividade, obteve-se os maiores valores de mediana de expressão nos tumores, em relação às margens, para o gene *IRX4* (2169,4 e 653,5 respectivamente; $p = 0,003$), seguido dos genes *HOXD11* (77,5 e 6,1 respectivamente; $p < 0,001$) e *HOXD10* (21,7 e 4,0 respectivamente; $p < 0,001$). Ao contrário, observaram-se valores maiores de mediana de expressão nas margens, em relação aos tumores, para os genes *PROX1* (17,6 e 3,4 respectivamente; $p = 0,001$), *ZHX1* (16,2 e 6,6 respectivamente; $p = 0,001$) e *HOXC13* (0,2 e 0,15 respectivamente), porém este último sem significância estatística (Tabela 5.5 e Gráfico 5.1).

Tabela 5.5 - Comparação das medianas da expressão segundo dois grupos definidos como tumor e margem

Gene	Tumor mediana (min-máx)	Margem mediana (min-máx)	p (*)
<i>HOXC13</i>	0,15 (0,00001-0,8)	0,16 (0,00001-58,4)	= 1,000
<i>HOXD10</i>	21,6* (0,00001-174,3)	4,02 (0,00001-58,3)	< 0,001
<i>HOXD11</i>	77,5* (0,00001-855,6)	6,06 (0,00001-639)	< 0,001
<i>IRX4</i>	2160,4* (0,00001-35260)	653,5 (0,00001-32914)	= 0,003
<i>PROX1</i>	3,4 (0,00001-35,5)	17,6* (0,00001-153,2)	= 0,001
<i>ZHX1</i>	6,6 (0,00001-20,7)	16,2* (0,00001-64,5)	= 0,001

*p: Teste não paramétrico de Mann- Whitney

Gráfico 5.1 - Gráficos dos valores das medianas de expressão de cada gene, de acordo com os grupos tumor e margem

* indica diferença estatisticamente significativa no tumor em relação à margem

indica diferença estatisticamente significativa na margem em relação ao tumor

5.3.2 Comparação das medianas da expressão segundo tumor e margem, conforme agressividade

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis revelou diferença estatisticamente significativa entre os valores das medianas correspondentes aos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* ($p < 0,001$; $p < 0,001$ e $p = 0,018$ respectivamente). Somente os genes *PROX1* e *ZHX1* apresentaram expressão maior nas margens com relação aos tumores ($p = 0,001$ para ambos).

A fim de se verificar entre que pares de grupos existiu diferença significativa, múltiplas comparações entre cada dois grupos foram realizadas baseadas na ordenação (*rank*) e aleatorização dos dados, considerando-se as possíveis permutações (rearranjos) de interesse (SIEGEL; CASTELLAN Jr, 1988). Foi observada expressão maior e estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* nos tumores menos agressivos em relação às margens correspondentes, bem como do gene *ZHX1* nas margens dos tumores menos agressivos em relação aos tumores correspondentes. Embora tenha sido detectada inicialmente diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *PROX1* entre os grupos, não houve poder suficiente para detectar onde estava a diferença (Tabela 5.6).

Os valores de mediana de expressão do gene *HOXC13* mostraram-se consideravelmente menores de maneira geral com relação aos outros genes estudados, e sem diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos ($p = 0,239$). No entanto, os valores maiores foram observados no grupo menos

agressivo, incluindo tumor (0,24) e margem (0,18), com relação ao grupo mais agressivo (0,16 nas margens e 0,08 nos tumores).

As comparações das medianas da expressão segundo os grupos mais e menos agressivos e suas margens correspondentes estão relacionadas de forma resumida na tabela 5.6, e as comparações múltiplas estão relacionadas na tabela 5.7. Os gráficos dos valores das medianas de expressão de cada gene, de acordo com os grupos de tumores mais e menos agressivos, bem como nas suas margens correspondentes, estão ilustrados no gráfico 5.2.

Tabela 5.6 - Comparação das medianas da expressão dos genes segundo quatro grupos definidos como margens e tumores mais e menos agressivos

Gene	Tumor menos agressivo	Margem menos agressivo	Tumor mais agressivo	Margem mais agressivo	p (*)
<i>HOXC13</i>	0,24	0,18	0,08	0,16	=0,239
<i>HOXD10</i>	29,2	2,1	18,5	5,55	<0,001
<i>HOXD11</i>	94,5	2,4	47,0	23,0	<0,001
<i>IRX4</i>	2598,7	576,1	1691,8	687,6	=0,018
<i>PROX1</i>	3,4	14,4	2,9	27,6	=0,010
<i>ZHX1</i>	6,0	14,6	8,2	20,5	=0,009

*p: Teste não paramétrico de Kruskal - Wallis

Tabela 5.7 - Múltiplas comparações das medianas de expressão dos genes entre cada dois grupos de interesse

Gene	Medianas de expressão			
	Tu-A x Tu+A	Tu-A x Ma-A	Tu+A x Ma+A	Ma-A x Ma+A
<i>HOXC13</i>	0,24 x 0,08	0,24 x 0,18	0,08 x 0,16	0,18 x 0,16
<i>HOXD10</i>	29,2 x 18,5	29,2 x 2,1*	18,5 x 5,55	2,1 x 5,55
<i>HOXD11</i>	94,5 x 47,0	94,5 x 2,4*	47,0 x 23,0	2,4 x 23,0
<i>IRX4</i>	2598,7 x 1691,8	2598,7 x 576,1*	1691,8 x 687,6	576,1 x 687,6
<i>PROX1</i>	3,4 x 2,9	3,4 x 14,4	2,9 x 27,6	14,4 x 27,6
<i>ZHX1</i>	6,0 x 8,2	6,0 x 14,6*	8,2 x 20,5	14,6 x 20,5

***p** ≤ 0,05: comparações múltiplas baseadas na estatística de Kruskal- Wallis

Tu+A= tumor mais agressivo, **Ma+A**= margem de tumor mais agressivo,

Tu-A= tumor menos agressivo, **Ma-A**= margem de tumor menos agressivo

Gráfico 5.2 - Gráficos dos valores das medianas de expressão de cada gene, de acordo com os grupos de tumores mais e menos agressivos, bem como nas suas margens correspondentes

* indica diferença estatisticamente significativa no tumor menos agressivo em relação à margem correspondente
indica diferença estatisticamente significativa na margem de tumores menos agressivos em relação ao tumor correspondente

5.4 Definição dos pontos de corte da curva ROC

Objetivando-se discriminar os tumores das margens bem como classificá-los em grupos, com a finalidade diagnóstica de indicar a presença ou a ausência de agressividade, admitindo-se uma determinada chance de erro, procedeu-se a realização da curva ROC. A tabela 5.8 descreve os valores de corte para diagnóstico de tumor e a tabela 5.9 para agressividade, estabelecidos para cada gene a partir de medidas de sensibilidade e especificidade. Somente os genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* assim como *PROX1* e *ZHX1* apresentaram área sob a curva ROC estatisticamente significativa para diagnóstico de tumor e agressividade, respectivamente, e foram selecionados para a análise de sobrevida.

Tabela 5.8 - Análise da curva ROC na definição de pontos de corte para diagnóstico de tumor

Gene	PC Tumor	Sensibilidade	Especificidade	AUC	p (*)
<i>HOXC13</i>	> 0,13	0,58	0,43	0,500	> 0,05
<i>HOXD10</i>	> 6,0	0,80	0,70	0,810*	< 0,05
<i>HOXD11</i>	> 25,0	0,80	0,77	0,772*	< 0,05
<i>IRX4</i>	> 1200,0	0,73	0,62	0,729*	< 0,05
<i>PROX1</i>	> 1,0	0,80	0,15	0,237	> 0,05
<i>ZHX1</i>	> 6,0	0,57	0,20	0,244	> 0,05

PC= ponto de corte, AUC= área abaixo da curva ROC

Tabela 5.9 - Análise da curva ROC na definição de pontos de corte para agressividade

Gene	PC Tu+A	Sensibilidade	Especificidade	AUC	p (*)
<i>HOXC13</i>	> 0,12	0,50	0,30	0,182	> 0,05
<i>HOXD10</i>	> 11,5	0,64	0,31	0,353	> 0,05
<i>HOXD11</i>	> 40,0	0,57	0,12	0,326	> 0,05
<i>IRX4</i>	> 1200	0,64	0,20	0,357	> 0,05
<i>PROX1</i>	> 1,5	0,79	0,44	0,533*	< 0,05
<i>ZHX1</i>	> 3,5	0,71	0,25	0,607*	< 0,05

Tu+A= tumor mais agressivo, PC= ponto de corte, AUC= área abaixo da curva ROC

5.5 Associação entre expressão dos genes *HOX*, variáveis clínicas e histopatológicas

O teste exato de Fisher mostrou que não houve associação significativa entre a expressão dos genes *homeobox* selecionados pela análise da curva ROC e as variáveis clínicas e histopatológicas propostas (Tabela 5.10). Porém, os resultados em relação aos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *ZHX* revelaram os menores valores de p, sendo que infiltração linfática esteve presente em todos os pacientes que apresentaram expressão elevada de *HOXD10* (Tabela 5.11) e *HOXD11* (Tabela 5.12), a maioria (88,9%) dos tumores com expressão elevada de *HOXD11* era moderadamente diferenciada (Tabela 5.13), infiltração perineural esteve presente na maioria (93,8%) dos tumores com expressão elevada de *HOXD11* (Tabela 5.14), e todos os pacientes com expressão elevada de *ZHX1* haviam deixado de beber ou fumar (Tabela 5.15).

Tabela 5.10 - Resultado do teste exato de Fisher para associação entre expressão dos genes *homeobox* com os dados clínicos e histopatológicos. Em negrito, observam-se os resultados que apresentaram valores de p mais próximos da significância

Variáveis	<i>IRX4</i> (p)	<i>HOXD10</i> (p)	<i>HOXD11</i> (p)	<i>ZHX1</i> (p)	<i>PROX1</i> (p)
Local	0,200	1,000	1,000	0,419	0,694
Fumo	0,621	1,000	1,000	0,143	1,000
Álcool	0,260	0,254	1,000	0,287	1,000
Fumo e álcool	0,364	0,645	1,000	0,071	0,682
Agressividade tumoral	1,000	0,378	0,378	1,000	1,000
Grau de diferenciação	0,661	0,660	0,184	0,678	1,000
IP	0,434	0,378	0,072	0,689	1,000
IL	1,000	0,155	0,155	0,643	0,682

IP= invasão perineural; IL= invasão linfática

Tabela 5.11 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD10* em relação à presença de infiltração linfática

Variável	Categoria	<i>HOXD10- ponto de corte para tumor</i>			p
		< 6,0	≥ 6,0	Total	
IL	ausente	27,3%	72,7%	100,0%	0,155
	presente	0,0%	100,0%	100,0%	
Total		20,0%	80,0%	100,0%	

Tabela 5.12 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD11* em relação à presença de infiltração linfática

Variável	Categoria	<i>HOXD11- ponto de corte para tumor</i>			p
		< 25,0	≥ 25,0	Total	
IL	ausente	27,3%	72,7%	100,0%	0,155
	presente	0,0%	100,0%	100,0%	
Total		20,0%	80,0%	100,0%	

Tabela 5.13 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD11* em relação ao grau de diferenciação histopatológica

Variável	Categoria	<i>HOXD11- ponto de corte para tumor</i>			p
		< 25,0	≥ 25,0	Total	
Grau dif.	MD	11,1%	88,9%	100,0%	0,184
	BD	33,3%	66,7%	100,0%	
Total		20,0%	80,0%	100,0%	

Tabela 5.14 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *HOXD11* em relação à presença de infiltração perineural

Variável	Categoria	<i>HOXD11- ponto de corte para tumor</i>			p
		< 25,0	≥ 25,0	Total	
IP	presente	35,7%	64,3%	100,0%	0,072
	ausente	6,3%	93,8%	100,0%	
Total		20,0%	80,0%	100,0%	

Tabela 5.15 - Resultado do teste exato de Fisher para nível de expressão de *ZHX1* em relação à interação fumo e álcool

Variável	Categoria	<i>ZHX1- ponto de corte para agressividade</i>			p
		< 25,0	≥ 25,0	Total	
Fumo e álcool	até o presente	36,4%	63,6%	100,0%	0,071
	no passado	0,0%	100,0%	100,0%	
Total		26,7%	73,3%	100,0%	

5.6 Análise de sobrevida

A ocorrência de recidiva foi observada em seis pacientes (20%), dentre eles quatro (66,7%) pertencentes ao grupo de tumores mais agressivos. Foi constatado o desenvolvimento de metástase regional e/ou local em três pacientes (10%), dentre eles dois (66,7%) pertencentes ao grupo de tumores mais agressivos, bem como de segundo tumor primário em três pacientes (10%), dois deles (66,7%) pertencentes ao grupo de tumores mais agressivos. Não foi observado o desenvolvimento de metástases à distância.

O período de seguimento dos pacientes variou de 4 a 60 meses, sendo que ao final deste período 12 pacientes (40%) foram a óbito, 11 deles (91,6%) devido à neoplasia e um paciente (8,4%) cuja causa do óbito foi edema pulmonar. Dos 18 pacientes vivos (60%), 16 (88,8%) não apresentaram evidências de doença durante todo o período de acompanhamento, um (5,6%) exibiu recidiva e outro (5,6%) desenvolveu um segundo tumor primário ao longo do período de seguimento. Para a sobrevida global, a média de sobrevida foi 45,7 meses; a sobrevida global no primeiro ano foi 77% e a sobrevida em cinco anos foi 43%. A tabela 5.16 apresenta a probabilidade de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier.

Na comparação das curvas de Kaplan-Meier, não foi observada diferença estatística entre as curvas de sobrevida das variáveis analisadas, embora tenha se observado uma tendência à significância na melhora de sobrevida em relação aos casos classificados como tumores menos agressivos bem como àqueles casos que exibiram infiltrado inflamatório ausente ou escasso (Gráfico 5.3). Quando se comparou os pontos de corte da curva ROC, foi observada uma diferença

acentuada, porém não estatisticamente significativa, para os níveis de expressão do gene *ZHX1* abaixo de 3,5. Isto é, níveis baixos de expressão de *ZHX1*, que foram classificados pela curva ROC como característica dos tumores menos agressivos, tendem a corresponder a uma melhora na sobrevida global (Gráfico 5.4). Quando se considerou o ponto de corte para diagnóstico de tumor, aqueles tumores com expressão de *IRX4* abaixo de 1200,0 corresponderam a uma tendência à melhora de sobrevida global (Gráfico 5.4). No gráfico 5.5 está representada a comparação das curvas de Kaplan-Meier para os genes *HOXD10*, *HOXD11* e *PROX1*, que apesar de exibirem bons valores de área sob a curva ROC sua expressão não influenciou a sobrevida global. Considerando a ausência de significância estatística nos testes de *log-rank* aplicados às curvas de Kaplan-Meier, assim como o pequeno número de óbitos (12 óbitos), não foi realizada a análise múltipla pelo modelo de Cox.

Tabela 5.16 - Probabilidade de sobrevida global pelo método de Kaplan-Meier

Variável	Categoria	Probabilidade de sobrevida acumulada			p
		após 12 m	após 24 m	após 60 m	
Sexo	F	100,0	50,0	0,00	0,142
	M	82,1	65,5	57,4	
Idade	40-64 anos	82,1	61,5	53,8	0,995
	≥ 65 anos	100,0	100,0	50,0	
Fumo	sim	82,6	62,8	52,4	0,845
	no passado	85,7	68,6	51,4	
Álcool	sim	80,0	61,0	48,7	0,657
	não/no passado	100,0	80,0	60,0	
Fumo e álcool	até o presente	81,8	61,0	48,8	0,826
	no passado	87,5	73,0	58,3	
Local	C02	91,7	65,6	42,2	0,766
	C04	77,8	64,6	64,6	
Grau Dif	BD	75,0	44,4	44,4	0,252
	MD	88,9	76,2	58,2	
IS	Sim	100,0	100,0	100,0	0,232
	Não	82,1	61,5	47,3	
IL	Sim	100,0	68,6	68,6	0,384
	Não	77,3	62,1	47,4	
IP	Sim	81,2	65,0	43,3	0,980
	Não	85,7	63,5	54,4	
II	Aus/escasso	84,6	76,1	76,1	0,244
	Mod/intenso	92,3	56,6	37,7	
Agress	Tu +A	78,6	47,6	31,7	0,081
	Tu -A	87,5	79,5	71,5	
PCtu HOXD10	< 6,0	83,3	83,3	50,0	0,940
	≥ 6,0	83,3	63,2	57,5	
PCtu HOXD11	< 25,0	83,3	83,3	44,4	0,870
	≥ 25,0	83,3	63,2	57,5	
PCtu IRX4	< 1200,0	89,0	89,9	62,2	0,560
	≥ 1200,0	81,3	57,5	57,5	
PCag ZHX1	< 3,5	75,0	75,0	75,0	0,510
	≥ 3,5	86,3	61,2	46,7	
PCag PROX1	< 1,5	80,0	60,0	50,0	0,778
	≥ 1,5	85,0	67,8	50,8	
Total		83,3	64,4	52,6	

Grau Dif= grau de diferenciação, **BD**= bem diferenciado, **MD**= moderadamente diferenciado, **IS**= infiltração sanguínea, **IL**= infiltração linfática, **IP**= infiltração perineural, **Aus**= ausente, **Mod**= moderado, **Agress**= agressividade tumoral, **PCtu**= ponto de corte para diagnóstico de tumor, **PCag**= ponto de corte para agressividade.

Gráfico 5.3 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier com relação à agressividade tumoral (A) e intensidade do infiltrado inflamatório (B)

Gráfico 5.4 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier com relação ao ponto de corte da expressão de *ZHX1* para agressividade (A) e com relação ao ponto de corte da expressão de *IRX4* para diagnóstico de tumor (B)

Gráfico 5.5 - Comparação das curvas de Kaplan-Meier com relação ao ponto de corte da expressão de *HOXD10* (A), *HOXD11* (B) para diagnóstico de tumor e de *PROX1* (C) para diagnóstico de agressividade

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço pode se originar de vários órgãos dessa região, incluindo a cavidade bucal, língua, faringe e laringe. As neoplasias dessas diferentes localizações exibem apresentações clínicas bem como curso clínico distintos, sendo associados a diferentes fatores de risco (DÖBROSSY, 2005) e características genéticas (TÍMÁR et al., 2005). No presente estudo, focou-se no carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, que correspondem aos locais mais freqüentemente acometidos pelo carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, e que apresentam um comportamento significativamente mais agressivo, com propensão à rápida invasão local e disseminação (FRANCESCHI et al., 1993).

Atualmente, a avaliação clínica associada ao exame histopatológico do material biopsiado ainda é o método de diagnóstico padrão na suspeita de carcinoma epidermóide de boca. O tamanho do tumor primário, obtido a partir do maior diâmetro da peça, e a espessura tumoral influenciam tanto a escolha quanto o desempenho do tratamento. Tipicamente, lesões T1 e T2 (até 4 cm) apresentam, respectivamente, 10 a 30% de risco de desenvolverem metástases regionais, enquanto lesões T3 e T4 (maiores que 4 cm), estão associadas com risco aumentado de recorrência local (ILDSTAD; BIGELOW; REMENSNYDER, 1983; SCHOLL et al., 1986; SHAHA et al., 1984; SUTTON et al., 2003; WOOLGAR et al., 1999), metástase linfonodal cervical (LEEMANS et al., 1994; MADDOX, 1984; WOOLGAR et al., 1999) e pior sobrevida (ARDUINO et al., 2008; MADDOX, 1984; PLATZ et al., 1983).

Assim como as margens livres de tumor são tradicionalmente utilizadas como parâmetro para definir a adequada ressecção da neoplasia e predição de menor risco de recorrência local e, conseqüentemente, melhora da sobrevida (LOREE; STRONG, 1990), os padrões histopatológicos de invasão e a distribuição das células neoplásicas em grandes ilhotas ou dispersas pelo tecido conjuntivo também são utilizados para predizer o comportamento do tumor (BRYNE et al., 1998; BRYNE et al., 1989; SAWAIR et al., 2003). De maneira geral, a localização, o tamanho e a espessura tumorais (principalmente em língua e assoalho bucal) bem como o grau de diferenciação histopatológica, o padrão de invasão do fronte tumoral, embolização vascular, infiltração perineural de grandes nervos e infiltração linfocitária na interface tumor-estroma são atualmente utilizados como previsores de risco de recorrência local e sobrevida global (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005; KOWALSKI; MEDINA, 1998; LO et al., 2003; RAHIMA et al., 2004; TAKES, 2004).

No presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa quando a expressão dos genes *homeobox* foi relacionada, a partir do ponto de corte fornecido pela análise da curva ROC, com localização anatômica e agressividade da neoplasia, tabagismo e/ou etilismo, diferenciação histopatológica, infiltrações linfática e perineural. Porém, os resultados em relação a algumas dessas correlações apresentaram baixos valores de p, a exemplo da maior expressão de *HOXD10* e *HOXD11* em todos os casos que exibiram infiltração linfática, e da maior expressão de *HOXD11* também na maioria dos casos que exibiram grau moderado de diferenciação e infiltração perineural. Como os genes *HOXD10* e *HOXD11* foram validados por qRT-PCR como hiper-expressos nos tumores menos agressivos em relação às suas margens, esperava-se que sua maior expressão não estivesse relacionada com características histopatológicas classicamente associadas com pior

comportamento clínico, mas sim presente em tumores bem diferenciados e que não exibissem infiltração linfática ou perineural. Uma possível explicação para este achado inesperado pode ser a casuística relativamente pequena associada à ampla variabilidade de expressão dos genes observada entre as amostras. Esses dados precisam ser confirmados utilizando-se um maior número de casos e por meio da análise complementar da expressão das proteínas HOXD10 e HOXD11 nos tumores e nas margens não tumorais correspondentes.

Um dos fatores principais que contribuem para o pior prognóstico dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de língua é o diagnóstico em estágios avançados na maioria dos casos. Aqueles pacientes diagnosticados e tratados precocemente geralmente apresentam uma melhor chance de cura e de desempenho funcional, refletindo em uma sobrevida média de 80% e melhora da qualidade de vida após o tratamento (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002). Entretanto, existe uma parcela de pacientes que vão a óbito devido à doença metastática, apesar da neoplasia ter sido diagnosticada em um estágio precoce, já que a detecção de metástases ocultas é difícil (SANO; MYERS, 2007). Sob outro aspecto, não está claro o porquê de alguns pacientes com doença local em estágio avançado desenvolverem metástases regionais mais lentamente, enquanto outros com lesões mais precoces evoluírem com envolvimento mais rápido e agressivo de linfonodos regionais. Também existem casos clínicos e histologicamente iguais que se comportam de modo diferente, ainda que conduzidos de modo semelhante. Nesse sentido, a utilização de métodos moleculares que auxiliem na determinação da agressividade do carcinoma epidermóide de boca a partir da análise do espécime originado do tumor primário é altamente valiosa.

Com o desenvolvimento das ferramentas de biologia molecular, inúmeros estudos têm mostrado que o perfil de expressão gênica possui correlação importante com o desenvolvimento e progressão tumoral, invasividade em linfonodos, recorrência da doença e desfecho clínico (ALIZADEH et al., 2000; GOLUB et al., 1999; ZIOBER et al., 2006). A resposta individual aos tratamentos também tem sido valorizada, já que mesmo nos estágios mais precoces da doença, o carcinoma epidermóide de boca pode variar dramaticamente na resposta ao tratamento preconizado. Conseqüentemente, um número significativo de pacientes com câncer de boca em estágio precoce, mas que acabam morrendo pela doença, poderia ser beneficiado por um tratamento mais agressivo. Por outro lado, uma cirurgia agressiva associada à radioterapia não é apropriada para todos os tipos de câncer de boca. A decisão de se optar por um tratamento mais agressivo é controversa e pode levar a grave comprometimento estético, impacto social e morbidade, sendo comuns tanto o sobre quanto o subtratamento.

A tentativa de elucidação dos eventos moleculares que governam o desenvolvimento e a progressão do carcinoma epidermóide de boca gera uma perspectiva de descoberta de genes e proteínas como biomarcadores para a detecção precoce, classificação dos tumores, identificação de alvos terapêuticos, e também para a seleção do tratamento mais adequado (GINOS et al., 2004; SOMOZA-MARTÍN et al., 2005; BELBIN et al., 2005; D'SILVA; WARD, 2007). Assim, uma combinação de marcadores moleculares com as características clínicas e histopatológicas torna-se uma possibilidade interessante.

Enquanto vários estudos se propõem a identificar padrões de expressão em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (ARORA et al., 2005; KUO et al., 2003; MÉNDEZ et al., 2002; ZIOBER et al., 2006), somente o trabalho de Ye et al., (2008)

teve o objetivo de identificar um padrão de expressão específico do carcinoma epidermóide de boca. Neste estudo o perfil global de expressão gênica foi obtido de um total de 53 amostras de carcinoma epidermóide de língua e 22 amostras de tecido normal correspondentes, sendo que a análise de 27 dos casos de tumores e 10 dos casos de tecido não tumoral correspondente se baseou em dados prévios de *microarray* (GEO database GSE2280 e GSE3524) previamente publicados por Toruner et al. (2004) e O'Donnel et al. (2005). Por meio da análise por PCA (*Principal Component Analysis*), uma aparente separação entre os grupos tumoral e não tumoral foi verificada. Entre os genes identificados e validados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico foram encontrados cinco membros da família das metaloproteinases (*MMP1*, *MMP3*, *MMP9*, *MMP10* e *MMP12*), e duas quimiocinas (*IL-8* e *CXCL1*). De acordo com os autores, a significativa hiper-expressão das metaloproteinases pode contribuir para a natureza agressiva do carcinoma epidermóide de língua assim como as quimiocinas podem estar relacionadas com a detecção precoce da neoplasia.

Contudo, atualmente nenhum marcador molecular foi incluído nas estratégias clínicas de detecção da presença de tumor e metástase nodal ou de tumores mais agressivos. Uma vez que vários genes já foram relatados em ensaios retrospectivos como capazes de fornecer informações diagnósticas independentes da classificação TNM, parece razoável a hipótese de que existam marcadores moleculares que possam definir subgrupos de pacientes que venham a desenvolver uma doença mais agressiva. Nesse sentido, o presente estudo pretendeu avaliar o padrão específico de expressão de genes *homeobox* no carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, além de propor uma comparação entre a expressão diferencial desses genes conforme critérios clínicos de agressividade.

A agressividade do carcinoma epidermóide de boca está relacionada com diferentes fatores, incluindo a gradação histológica, tamanho do tumor, nível de comprometimento dos tecidos adjacentes, presença de metástase no momento do diagnóstico e localização anatômica da neoplasia (BRYNE et al., 1998; TODD; DONOFF; WONG, 1997). No entanto, os critérios de agressividade para a formação dos grupos de tumores mais e menos agressivos do presente estudo teve como base o que se observa na clínica oncológica de cabeça e pescoço, ou seja, aqueles tumores pequenos (T1/T2) que já apresentam metástase (N+) ao diagnóstico foram considerados de comportamento mais agressivo, bem como os tumores grandes (T3/T4) sem evidências de metástase ou infiltração (N0) foram classificados clinicamente como lesões menos agressivas. Com o presente estudo pretendeu-se, então, encontrar fundamento biológico para este critério clínico.

Sendo assim, a partir dos dados gerados por um *microarray* com 55.000 genes, seis genes *homeobox* foram identificados como significativamente hiper-expressos nas amostras de carcinoma epidermóide de língua e assoalho, três pertencentes ao grupo de *homeobox* agrupados (*HOXC13*, *HOXD10* e *HOXD11*) e três aos não agrupados (*PROX1*, *IRX4* e *ZHX1*). De maneira geral, o qRT-PCR validou os dados de *microarray* somente com relação a hiper-expressão dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* nos tumores com relação às margens. No entanto, quando se considerou a agressividade, somente foram validados os resultados de hiper-expressão do gene *HOXD11* nos tumores menos agressivos com relação às suas margens correspondentes. Diante disso, uma possível justificativa da não validação completa por qRT-PCR dos dados gerados pelo *microarray* é a diferença na amostragem e na sensibilidade das técnicas. A amostragem utilizada na validação por qRT-PCR, embora também considerada pequena, é superior e, na maior parte,

independente daquela utilizada nos experimentos de *microarray*, conforme os anexos C e D. Ainda, a sensibilidade do qRT-PCR é maior que a do *microarray*, cuja análise para alguns dos genes revelou níveis de expressão próximos ao *background*, como por exemplo para o gene *PROX1*. Além disso, embora a qualidade do RNA das amostras utilizadas tenha sido considerada boa ou satisfatória, os genes *homeobox* são sabidamente de baixa expressão, comprovado pelo elevado Ct médio apresentado a cada amplificação, sendo que a interferência da qualidade do RNA pode ter sido mais impactante no estudo da expressão desses genes. Sendo assim, um aspecto a ser sugerido é a utilização de um número maior de casos e, ainda, a análise dos níveis protéicos por ELISA, *Western blot* ou imunohistoquímica, que pode ter grande importância no estudo dos genes *homeobox* em casos de carcinoma epidermóide de boca, visto que as proteínas são moléculas mais estáveis e complementam os achados encontrados por qRT-PCR.

Sabe-se que os genes *homeobox* estão ativos em células adultas normais, controlando e regulando a identidade celular (diferenciação), divisão, adesão, migração e apoptose (ABATE-SHEN, 2002), e que cada órgão adulto apresenta um padrão específico de expressão desses genes, diferindo principalmente em relação aos que estão ativos e silenciados (MAROULAKOU e SPYROPOULOS, 2003). Dados de expressão gênica por SAGE (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene>) revelam a distribuição da expressão dos genes *homeobox* estudados no presente trabalho ao longo do corpo humano, desde o período embrionário para alguns (*PROX1* e *ZHX1*), até o fetal (todos), neonatal (*ZHX*), infantil (*PROX1*), juvenil (*HOXD11* e *PROX1*) e adulto (todos). Estes genes estão expressos em condições de saúde e doença, sendo que, em condições normais, somente os genes *HOXC13* e *ZHX1* apresentam transcritos em boca.

Após uma busca no GEO *Profiles* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a respeito da expressão desses genes *homeobox* em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e, especificamente, de boca, foram encontrados quatro registros com dados de *microarray*. Entre eles, constavam estudos sobre o perfil de expressão gênica em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (GDS 2520), e desses tumores com relação a presença ou ausência de infecção por HPV (GDS 1667), o perfil de expressão gênica em carcinoma epidermóide de boca em relação à presença ou ausência de metástases linfonodais (GDS 1062), e o perfil de expressão gênica de células isoladas de carcinoma epidermóide de boca por microdissecção a laser com relação à invasividade (GDS 1584). Entre os genes encontrados, estavam presentes em mais de um estudo os genes *HOXD10* (GDS 1667, GDS 2520 e GDS 1062), *HOXD11* (GDS 1667, GDS 1062 e GDS 1584) e *PROX1* (GDS 1667, GDS 2520, GDS 1062 e GDS 1584). Os genes *IRX4* e *ZHX1* foram encontrados apenas em um estudo (GDS 1062 e GDS 1667, respectivamente), e nenhuma referência foi encontrada para o gene *HOXC13*. Embora presentes na base de dados do GEO *Profiles*, os artigos originais que foram gerados a partir desses resultados (KURIAKOSE et al., 2004; O'DONNELL et al., 2005; TORUNER et al., 2004; SLEBOS et al., 2006) não ressaltam a hiper ou a hipo-expressão dos genes *homeobox*, provavelmente porque a razão da expressão desses genes (*fold change*) entre os grupos amostrais foi pequena. Isso realmente foi observado em nossas amostras, em que a razão da expressão estabelecida foi acima de duas vezes entre tecido tumoral e margem correspondente, com destaque para a expressão do gene *HOXD11* que foi 90 vezes maior nos tumores menos agressivos em relação às suas margens. Especificamente em relação ao gene *HOXD11*, Rossi Degl'Innocenti et al. (2007) observaram a presença de seus transcritos em carcinoma gástrico sugerindo

sua participação no desenvolvimento da neoplasia. Embora as vias celulares que envolvam o gene *HOXD11* também não sejam claramente compreendidas, os autores sugerem sua participação como mediador da regulação da proliferação celular e reposta apoptótica.

Entre os genes estudados neste trabalho, apenas os genes *HOXC13*, *HOXD10* e *HOXD11* já foram realmente descritos na literatura como hiper-expressos em carcinoma epidermóide de boca em relação ao tecido normal (HASSAN et al., 2006). Nessa pesquisa, os níveis de expressão de 39 genes *HOX* foram analisados por qRT-PCR em 31 amostras de carcinoma epidermóide de boca, 11 casos de displasia epitelial e 10 amostras de mucosa bucal normal. Os autores observaram aumento significativo da expressão de 18 genes *HOX*, entre eles os genes *HOXC13*, *HOXD10* e *HOXD11*, nas amostras de carcinoma quando comparadas à mucosa normal, bem como super-expressão de *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXB3* e *HOXD10* nos casos de displasia com relação à mucosa normal, e hipo-expressão de *HOXA1*, *HOXB7*, *HOXB9* e *HOXC8* com relação às amostras de carcinoma. Além disso, os carcinomas epidermóides de boca com metástase linfonodal exibiram expressão mais elevada de *HOXC6* quando comparados com aqueles sem metástase. Nossos achados de super-expressão dos genes *HOXD10* e *HOXD11* nos tumores em relação às margens correspondentes corroboram com os resultados de Hassan et al. (2006), fortalecendo a hipótese de que a expressão alterada destes genes em particular pode estar envolvida no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de boca. Entretanto, a ausência de expressão diferencial do gene *HOXC13* entre as amostras de tumores e margens observada em nosso estudo não está de acordo com os achados de Hassan et al. (2006), o que pode ser devido ao menor número de casos que foi avaliado para este gene em nosso estudo ou, ainda, pode sugerir

que o gene *HOXC13* desempenhe papel importante na manutenção da arquitetura tecidual e função da mucosa bucal adulta.

A partir dos achados de aumento da expressão dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* observados nos tumores, podemos sugerir que esta expressão desregulada contribuiu para a alteração do fenótipo e do comportamento celular, levando à diminuição da diferenciação e promoção da proliferação e sobrevivência celular, aumentando a predisposição para o desenvolvimento e/ou progressão tumoral. De acordo com Abate-Shen (2002), estes genes *homeobox* poderiam estar re-expressos nas células tumorais derivadas do epitélio bucal, caso estes genes sejam normalmente expressos apenas durante a embriogênese, ou representarem uma “nova” expressão caso estes genes expressos nas células tumorais não sejam normalmente expressos nas células epiteliais durante a embriogênese. Talvez a hipótese de re-expressão seja mais provável, já que os dados de expressão gênica por SAGE não mostram a presença de transcritos dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* em boca, em condições normais. Por outro lado, a menor expressão dos genes *PROX1* e *ZHX1* nos tumores quando comparado com as margens, revelada pela análise por qRT-PCR, pode significar que estes genes estão freqüentemente expressos em tecidos adultos e têm uma expressão reduzida ou silenciada em cânceres (ABATE-SHEN, 2002).

Em relação à maior expressão dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* em tumores menos agressivos em relação às margens correspondentes, podemos sugerir seu possível silenciamento por metilação nos tumores mais agressivos. Em concordância, Carrio et al. (2005) observaram que a expressão de *HOXD10* se reduzia progressivamente nas células epiteliais neoplásicas de mama conforme o aumento da malignidade. Ainda, *HOXD10* é capaz de reverter o fenótipo de uma

linhagem celular tumoral de mama altamente invasiva (MDA-MB-231) para um estado não maligno, por meio da restauração das interações normais célula-célula e célula-matriz extracelular, quando cultivadas em um modelo tridimensional de membrana basal rica em laminina (3DlrbM). Em estudo mais recente sobre a importância dos micro-RNAs no câncer de mama, observou-se que a expressão do micro RNA miR-7 é positivamente regulada por *HOXD10*, o que resulta na inibição da expressão de Pak1, uma quinase amplamente super-regulada em várias neoplasias humanas e que desempenha funções na motilidade e sobrevivência celular, invasão e mitose. Então, de acordo com os autores, a perda de expressão de *HOXD10* leva ao aumento da invasividade (REDDY et al., 2008). O gene *HOXD11* parece estar silenciado por metilação em cânceres de mama e ovário bem como em melanomas. Após pesquisa genômica de amplo espectro em busca de metilação aberrante em câncer de mama, Miyamoto et al. (2005) encontraram 20 genes metilados em pelo menos uma das oito linhagens estudadas, sendo 15 destes genes também metilados em mais de um dos 21 casos de câncer de mama primário estadios I ou II. Neste trabalho, o gene *HOXD11* encontrou-se entre os cinco genes metilados em mais de 10 casos de câncer de mama, sendo agrupado entre os genes candidatos como biomarcadores deste tipo de tumor. Da mesma forma, Cai et al. (2007), observaram metilação aberrante de ilhas CpG supostamente promotoras de sete genes em linhagens celulares de câncer de ovário, sendo quatro delas também metiladas em amostras de câncer ovariano primário. Entre estes genes, o *HOXD11* encontrou-se metilado em quatro das nove linhagens estudadas, e em um dos 15 casos de câncer ovariano primário. Em melanomas humanos, Furuta et al. (2006) revelaram a importância das ilhas CpG em 34 genes, entre eles o *HOXA9*, *HOXD11*, *HOXD12* e *HOXD13*. Estudos como estes descritos acima sugerem que o

silenciamento de genes específicos e o perfil de metilação de um grupo de genes podem ser utilizados como biomarcadores clínicos para predizer resposta a drogas e prognóstico (LAIRD, 2003; MIYAMOTO; USHIJIMA, 2005), inclusive em relação à agressividade tumoral.

Com relação ao gene *IRX4*, a participação da família de genes *IRX* não é destacada na literatura. Neste contexto, apenas Lewis et al. (1999) procuraram relacionar a expressão de *IRX2* em neoplasias mamárias, concluindo que sua expressão é mantida nestes tumores independente do tipo, gradação, estado do paciente, presença/ausência de metástase. A possível metilação desses genes no carcinoma epidermóide de boca merece ser estudada posteriormente.

Com relação ao gene *PROX1*, entre suas funções biológicas especula-se que este gene exerça uma regulação negativa da proliferação celular e induza a diferenciação, de forma análoga ao seu papel no sistema nervoso central (WELHAM et al., 2005), além de estar envolvido na angiogênese e linfangiogênese (HONG et al., 2002), etapas importantes no crescimento e disseminação tumorais, podendo apresentar importância prognóstica em tumores sólidos. Neste contexto, van der Auwera et al. (2004) observaram intensa atividade angiogênica e presença de linfangiogênese ativa em câncer de mama inflamatório, uma forma distinta e agressiva de carcinoma mamário localmente avançado caracterizada microscopicamente por extensa invasão linfovascular com conseqüente embolia tumoral. Neste estudo, os autores relataram expressão aumentada de mRNA de vários fatores relacionados com linfangiogênese e angiogênese tumoral, inclusive de *PROX1* em casos de tumores de mama inflamatórios comparados com não inflamatórios, o que possivelmente explica o elevado potencial metastático do primeiro por meio de via linfática e hematogênica.

O gene *PROX1* está localizado no braço longo do cromossomo 1 (1q32), onde Nagai et al. (1999) observaram perda de heterozigose em linfomas. Em algumas situações, o gene *PROX1* também parece suprimir a proliferação celular, provavelmente regulando o ciclo celular e, assim, podendo ter participação importante no processo de tumorigênese. Em estudo mais recente, Nagai et al. (2003) demonstraram pontos de mutação do gene *PROX1* em quatro linhagens celulares tumorais linfóides, que resultaram em substituições de aminoácidos e proteínas truncadas. Ainda, a expressão do gene *PROX1* encontrou-se silenciada em várias linhagens celulares tumorais hematológicas, especialmente naquelas que não apresentaram mutações no mesmo gene, provavelmente devido à metilação do íntron 1 do DNA. Esses achados sugerem que a metilação do DNA nesta região pode ser um mecanismo de inativação do gene *PROX1* em linhagens celulares tumorais hematológicas e linfomas primários. Além disso, estudos que utilizaram camundongos nulos de *Prox1* revelam que sua inativação causa proliferação celular anormal, regulação negativa dos inibidores do ciclo celular p57KIP2 e p27KIP1, alteração da expressão de caderina-E e apoptose inapropriada (WINGLE et al., 1999). De fato, a perda de expressão de caderina-E é freqüentemente observada em carcinomas, sendo que no carcinoma epidermóide de boca essa expressão reduzida se correlaciona tumores pouco diferenciados e pouco invasivos (MATTIJSEN; PETERS; SCHALKWIJK, 1993; SAKAKI et al., 1999). Li e Vassin (2000) também relatam que a perda de função de *Prox1* resulta em expressão aberrante de genes reguladores do ciclo celular. Sendo assim, a suposta perda de expressão do gene *PROX1* nos tumores analisados no presente estudo pode significar sua importância no desenvolvimento tumoral por meio de sua influência em alguns dos processos importantes para a proliferação e diferenciação celular.

Os resultados de qRT-PCR encontrados no presente estudo estão concordantes com os achados de menor proliferação celular na presença de expressão elevada de *PROX1*, como ocorreu nas margens tumorais em relação aos tumores, e podendo refletir uma aparente inibição da expressão desse gene em tumores por mecanismos epigenéticos, e sugerindo que o gene *PROX1* possa funcionar como um gene supressor tumoral. Portanto, estudos ainda são necessários para se tentar estabelecer uma relação direta entre *PROX1* e outros genes envolvidos no ciclo celular, na tentativa de se elucidar os aspectos funcionais da supressão tumoral.

A família *ZHX* (zinc fingers and homeoboxes) de fatores transcricionais possui três membros (*ZHX1*, *ZHX2* e *ZHX3*) cujas proteínas contêm dois domínios tipo dedos de zinco e cinco homeodomínios, e possuem localização nuclear (CHUGH, 2007). Um estudo de expressão gênica em mieloma múltiplo ressalta a relação de alguns genes com o prognóstico da doença, entre eles o *ZHX2*, cuja perda de expressão parece revelar um fenótipo mais agressivo (HAROUSSEAU; SHAUGHNESSY JR; RICHARDSON, 2004). Além disso, observou-se correlação negativa entre a expressão de *ZHX2* e de um painel de 30 genes associados com a proliferação, incluindo aqueles regulados positivamente pelo fator de transcrição NF-Y. Assim, o gene *ZHX2* se comporta como um regulador negativo desse fator de transcrição (SCHEY et al., 2004), gerando implicações relevantes já que o complexo NF-Y é um regulador transcricional importante de muitos genes envolvidos no controle do ciclo e da proliferação celular.

Embora a função biológica de *ZHX1* permaneça obscura até o momento, evidências atuais relacionam seu envolvimento no crescimento celular e diferenciação. Yamada et al. (2002) especulam que a indução de *ZHX1* interage

diretamente com fatores de transcrição e cessa a atividade dos mesmos, inibindo a transcrição gênica, o que leva a célula a transitar de um estado diferenciado para indiferenciado. Além disso, tem sido relatado que regiões reguladoras transcricionais interagem com co-fatores para funcionar como repressores transcricionais; neste caso, o *ZHX1* interage um com co-repressor e reprime a transcrição gênica. Assim, a identificação de genes-alvo do *ZHX1* e de proteínas que interagem com a proteína *ZHX1* torna-se assunto interessante.

De forma complementar, objetivou-se verificar se alguns dos genes *homeobox* estudados teriam o poder diagnóstico de discriminar casos de tumor e não tumor (margem). Após a análise da área sob a curva ROC, os genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* exibiram valores com poder estatístico para serem considerados marcadores de tumor. Entretanto, somente houve influência na sobrevida, embora não estatisticamente significativa, quando se analisou o gene *IRX4*; isto é, os pacientes cuja expressão de *IRX4* foi alta, ou seja, maior ou igual ao ponto de corte (1200) tiveram uma tendência a um menor tempo de sobrevida global. O estabelecimento de pontos de corte para expressão de genes e/ou proteínas é uma abordagem interessante e tem sido alvo de estudos importantes (ZHOU et al., 2006; CHATTOPADHYAY; RAY, 2008) especialmente quando se pretende diagnosticar com precisão casos intermediários; por exemplo, uma lesão com displasia discreta de uma moderada ou uma lesão cancerizável exibindo displasia intensa de um carcinoma *in situ*, ou classificar comportamento biológico das doenças. Zhou et al. (2006) encontraram resultados clinicamente bastante relevantes ao testar o poder preditivo de genes selecionados por *microarray* e validados por qRT-PCR para desenvolvimento de metástase nodal e disseminação extra-capsular de casos de carcinoma epidermóide de língua. A análise da área abaixo da curva ROC mostrou

os melhores valores preditivos para *CTTN* e *MMP9*, sendo que as combinações específicas de marcadores determinada por um modelo logístico foi *CTTN+MMP9+EGFR* para metástase e *CTTN+EEF1A1+MMP9* para disseminação extra-capsular.

Com o objetivo semelhante ao de Zhou et al. (2006) e também utilizando-se a metodologia da análise da curva ROC, buscou-se verificar se alguns dos genes *homeobox* estudados teriam o poder preditivo para discriminar casos de tumores mais e menos agressivos. Embora nenhuma das áreas sob a curva ROC tenha sido ideal, os genes que mais se aproximaram da significância foram o *PROX1* e o *ZHX1*. É importante salientar que esta análise é totalmente independente da comparação das medianas de expressão e que, por isso, genes que foram encontrados com expressão maior nas margens também puderam ser avaliados quanto ao potencial de marcador de agressividade. Ao analisar a possível influência do nível de expressão de ambos os genes na sobrevida, observou-se que os tumores que apresentavam níveis baixos de expressão de *ZHX1* (abaixo do ponto de corte de 3,5), que foram classificados pela curva ROC como característica dos tumores menos agressivos, tendem a corresponder a uma melhora na sobrevida global, embora não estatisticamente significativa. Sendo assim, não foi possível estabelecer, dentre os genes *homeobox* validados por qRT-PCR, um gene ou uma combinação deles que pudesse(m) ser utilizado(s) como marcador(es) de agressividade tumoral. Como justificativa, pode-se, novamente, ressaltar a necessidade de uma amostra maior, a possibilidade de que os tecidos da margem tumoral, embora morfológicamente normais, pudessem apresentar alterações em nível molecular e, ainda, que os critérios utilizados para classificar os tumores em mais ou menos agressivos não terem sido os mais adequados.

Considerando-se a hipótese de cancerização de campo da cavidade bucal (SLAUGHTER et al., 1953), que afirma que múltiplos grupos celulares passam independentemente por transformação neoplásica sob o estresse da atividade carcinogênica regional, a não inclusão de um terceiro grupo (controle) composto por indivíduos não portadores de carcinoma epidermóide bucal e que não apresentassem o vício de fumar e/ou beber é justificada pela tentativa de se evitar o questionamento se as diferenças na expressão gênica encontradas estariam relacionadas a possíveis variações individuais. Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que a mucosa obtida das margens do carcinoma epidermóide embora exibisse características morfolologicamente normais, seu padrão genético pudesse estar alterado, incluindo alterações no padrão de expressão dos genes *homeobox*. De fato, no trabalho de Destro (2008), ao contrário do observado em amostras de mucosa oral normal de pacientes sem fatores de risco para o carcinoma epidermóide, as amostras de mucosa morfolologicamente normal de pacientes portadores da neoplasia expressaram um número maior de genes *HOX* na maioria das amostras.

Embora vários autores ressaltem a necessidade em se estabelecer critérios clínicos de agressividade, para que se possa buscar fundamentos na biologia molecular do tumor primário, não há consenso a respeito de qual seria a melhor forma de discriminar os tumores mais dos menos agressivos. Esta questão é abordada no estudo de Toruner et al. (2004), quando os autores afirmam que há poucos estudos que objetivam correlacionar as alterações de expressão gênica no carcinoma epidermóide de boca com variáveis clinicamente relevantes. Neste estudo, os dados de expressão gênica foram agrupados de acordo com a extensão da infiltração do tumor, ou seja, o perfil de expressão gênica foi associado com a

profundidade da invasão tumoral ao invés de com infiltração linfática, em contraste com outros estudos (NAGATA et al., 2003), apresentando diferenças de expressão quando se analisou tecido normal, tumores T1/T2 e tumores T3/T4.

Comparando-se os critérios escolhidos para se formar os grupos do presente estudo e o estudo de Zhou et al. (2006), neste foram utilizados 25 casos de carcinoma epidermóide exclusivamente de língua e todos com estágio patológico T4, sendo a diferença entre eles a presença ou não de metástase nodal e disseminação extra-capsular. Talvez uma seleção de amostras como essa seja mais homogênea e capaz de gerar dados mais consistentes. Analisando os resultados do presente estudo, acreditamos que uma melhor abordagem futura fosse manter a divisão por sítio anatômico, analisando apenas os casos C02 e C04, e talvez classificar os grupos de tumores mais e menos agressivos conforme o desfecho após o diagnóstico (óbito ou não), a partir da análise da sobrevida. Sendo assim, os casos menos agressivos corresponderiam, clinicamente, àqueles casos pT1/T2 que, tratados com finalidade curativa, de fato se curaram, enquanto os casos mais agressivos seriam aqueles pT1/T2 que morreram da doença apesar de tratados com intenção curativa. Seriam então formados quatro grupos, sendo os pacientes que sobreviveram controles dos que morreram: T1/T2 N0 morto x T1/T2 N0 vivo e T1/T2 N1 morto x T1/T2 N1 vivo. Com esses critérios, seria formado um grupo homogêneo quanto ao sítio primário, estadiamento patológico e tratamento. A única diferença seria que alguns tumores apresentariam recidiva e outros não, alguns pacientes morreriam outros sobreviveriam, e a resposta a estes acontecimentos poderia ser obtida por meio da análise molecular dos espécimes.

A busca de informações a respeito da genética do câncer está totalmente voltada para a identificação de potenciais marcadores biológicos, com vistas ao refinamento diagnóstico, e conseqüente identificação de importantes alvos terapêuticos. Entretanto, nenhum gene relatado até o presente na literatura mostrou utilidade diagnóstica suficiente no carcinoma epidermóide de boca. Então, como em muitas outras neoplasias, o diagnóstico clínico associado aos padrões de expressão de grupos de genes é que provavelmente mostrará correlações importantes com o comportamento tumoral e desfecho clínico. Em relação ao carcinoma epidermóide de boca, os resultados aqui apresentados em conjunto com os trabalhos anteriores (ZHU et al., 2004; MATIZONKAS-ANTONIO, 2005; HASSAM et al., 2006; LIBORIO DOS SANTOS, 2008) sugerem que alguns membros da família dos genes *homeobox* (*QUOX1*, alguns membros *HOX*, *IRX4* e o *TGIF1*) possuem papel importante na carcinogênese de boca.

Para um melhor entendimento sobre o papel de genes *homeobox* na carcinogênese, é necessário esclarecer de que maneira ocorre cooperação entre esses genes na regulação da proliferação e diferenciação celular, se suas proteínas atuam somente como fatores de transcrição e se o seu homeodomínio é necessário para todas as suas funções (CHEN; SUKUMAR, 2003). Ainda pouco se sabe sobre as funções específicas dos genes *homeobox*, em especial dos membros da família *HOX*, devido a sua maneira complementar e redundante de agir e a sua capacidade/necessidade de interagir com co-fatores (GRIER et al., 2005). Além disso, a expressão dos genes *HOX* parece ser específica para cada tipo de tecido adulto, dificultando ainda mais a compreensão do papel destes genes. O que se sabe até o presente é que as proteínas *HOX* interagem com várias vias de sinalização reguladoras, incluindo FGF, BMP, ácido retinóico e esteróides sexuais,

por meio de uma regulação dependente e independente de co-fatores (SVINGEN; TONISSEN, 2006).

As alterações de expressão dos genes *HOX* já foram relacionadas com perda do padrão de metilação (SHIRAISHI et al., 2002; STRATHDEE et al., 2007a; STRATHDEE et al., 2007b), sua regulação pós-transcricional através da associação com seus co-fatores PBX1 e MEIS1 (SVINGEN; TONISSEN, 2006), e a presença de FGF e ácido retinóico (DIEZ DEL CORRAL; STOREY, 2004). Especificamente com relação ao FGF, pode-se sugerir que esse fator de crescimento contribui para a oncogênese de boca via indução de genes *HOX*, já que Cohn et al. (1997) demonstraram que a expressão de alguns genes da família *HOX* é modulada após o tratamento com FGF, enquanto a expressão elevada de FGF1 e FGF2 (MYOKEN et al. 1994) e dos receptores de FGFs (FGFR2 e FGFR3) (WAKULICH et al. 2002) já foram relatadas em carcinomas epidermóides de boca.

Apesar da validação da hiper-expressão dos genes *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* no carcinoma epidermóide de boca, a abordagem metodológica do presente estudo não permite avaliar de que maneira estes genes poderiam cooperar na carcinogênese oral, porém, pode-se sugerir que a elevada expressão do gene *IRX4* nos tumores pode estar relacionada a um prognóstico pior para os pacientes portadores de carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal, já que foi relacionada com uma tendência à menor sobrevida global.

Embora vários estudos tenham relatado diferenças na expressão de genes *homeobox* entre tecidos normais e neoplásicos, existem escassos trabalhos a respeito de suas funções no câncer. Em geral, tem-se obtido informações úteis por meio do monitoramento das respostas biológicas nos modelos em que a expressão de um gene *homeobox* em particular foi alterada. Essas abordagens experimentais

apresentam grandes limitações e são complicadas pela redundância funcional implícita no sistema de genes *homeobox*, especialmente *HOX*. Tentativas de elucidação da função desses genes na transformação maligna serão beneficiadas pela compreensão dos reguladores a montante (*upstream*) e dos genes-alvo a jusante (*downstream*) dos genes *homeobox*. Atualmente, relativamente poucos genes-alvo diretos dos genes *homeobox* foram definitivamente identificados, entre eles as caderinas, *BMPs*, *TP53*, caspases, integrinas e fatores de crescimento (GRIER et al., 2005). Abordagens experimentais em que alterações da expressão de genes *homeobox* causem mudanças mensuráveis nos processos celulares devem fornecer novas informações a respeito da ativação de seus genes-alvo. Um verdadeiro teste para análise de suas potenciais funções seria a utilização de modelos *knockout* bem como de super-expressão dos genes *homeobox*, para que seu papel pós embrionário e funções na carcinogênese possam ser descobertos.

7 CONCLUSÕES

1. Seis transcritos de genes *homeobox* (*HOXC13*, *HOXD10*, *HOXD11*, *PROX1*, *ZHX1* e *IRX4*) estão hiper-expressos no carcinoma epidermóide de boca a partir da análise dos dados gerados por *microarray*.
2. O aumento da expressão de *HOXD10*, *HOXD11* e *IRX4* foi validado por meio de qRT-PCR, e sugere que a expressão alterada desses gene pode participar do desenvolvimento do carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal.
3. A maior expressão dos genes *PROX1* e *ZHX1* nas margens tumorais com relação aos seus tumores correspondentes não validou os dados do *microarray*, e pode refletir a perda de função ou o silenciamento dos genes *PROX1* e *ZHX1* no carcinoma epidermóide de língua e/ou assoalho bucal.
4. Os dados sugerem uma possível associação entre a expressão de *HOXD11* e presença de infiltrações linfática e perineural, e grau moderado de diferenciação da neoplasia.
5. Os dados sugerem uma possível associação entre a expressão de *HOXD10* e infiltração linfática.
6. Os dados sugerem um valor prognóstico para a presença de transcritos do gene *IRX4* na neoplasia, já que a expressão elevada de *IRX4* aparentemente pode implicar em um menor tempo de sobrevida global.

REFERÊNCIAS¹

Abate-Shen C. Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? *Nature* 2002;2(10):777-85.

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403(6769):503–11.

American Cancer Society. American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 5th ed. Chicago: Lippincott- Ravan;1997.

Arduino PG, Carrozzo M, Chiecchio A, Broccoletti R, Tirone F, Borra E, et al. Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2008;66(8):1570-9.

Armitage P, Berry G. Statistical methods in medical research. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1994.

Arora S, Matta A, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Identification of differentially expressed genes in oral squamous cell carcinoma. *Mol Carcinog* 2005;42(2):97-108.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000;25(1):25-9.

Awgulewitsch A. Hox in hair growth and development. *Naturwissenschaften* 2003; 90(5):193–211.

Belbin TJ, Singh B, Smith RV, Socci ND, Wreesmann VB, Sanchez-Carbayo M, et al. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2005;131(1):10–8.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Boudreau N, Andrews C, Srebrow A, Ravanpay A, Cheresh DA. Induction of the angiogenic phenotype by Hox D3. *J Cell Biol* 1997;139(1):257–64.

Boudreau NJ, Varner JA. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha5beta1 expression and function during angiogenesis. *J Biol Chem* 2004;279(6):4862-8.

Brandão LG, Cavaleiro BG, Sondermann A. Apresentação clínica e estadiamento. In: Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 10, p. 71-9.

Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 2005;29(2):167–78.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos / traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6. ed. - Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Brener S, Jeunon FA, Barbosa AF, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão da literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Canc* 2007;53(1):63-9.

Brennan J, Boyle J, Kock W, Goodman S, Hruban R, Eby Y. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in head and neck squamous carcinoma. *N Engl J Med* 1995;332(11):712-7.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, Reis EM, Neves EJ, de Souza SJ, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(2):95-105.

Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, et al. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res* 1998;18(6B):4757–64.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989;18(8):432–7.

Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15(3):155-66.

Cai LY, Abe M, Izumi S, Imura M, Yasugi T, Ushijima T. Identification of PRTFDC1 silencing and aberrant promoter methylation of GPR150, ITGA8 and HOXD11 in ovarian cancers. *Life Sci* 2007;80(16):1458-65.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996;56(11):2488-92.

Cardinali M, Pietraszkiewicz H, Ensley JF, Robbins KC. Tyrosine phosphorylation as a marker or aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. *Int J Cancer* 1995;61(1):98-103.

Care A, Felicetti F, Meccia E, Bottero L, Parenza M, Stoppacciaro A, et al. HOXB7: a key factor for tumor-associated angiogenic switch. *Cancer Res* 2001;61(17):6532–9.

Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, et al. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol* 1996;16(9):4842-51.

Carrio M, Arderiu G, Myers C, Boudreau NJ. Homeobox D10 induces phenotypic reversion of breast tumor cells in a three-dimensional culture model. *Cancer Res* 2005; 65(16):7177-85.

Chang PY, Kozono T, Chida K, Kuroki T, Huh N. Differential expression of Hox genes in multistage carcinogenesis of mouse skin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;248(3):749-52.

Chattopadhyay A, Ray JG. AgNOR cut-point to distinguish mild and moderate epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2008;37(2):78-82.

Chen H, Sukumar S. Hox genes: emerging stars in cancer. *Cancer Biol Therapy* 2003;2(4):524-5.

Chen Y, Knosel T, Ye F, Pacyna-Gengelbach M, Deutschmann N, Paterson I. Decreased PITX1 homeobox gene expression in human lung cancer. *Lung Cancer* 2007;55(3):287-94.

Chugh SS. Transcriptional regulation of podocyte disease. *Transl Res* 2007;149(5):237-42.

Cillo C, Cantile M, Mortarini R, Barba P, Parmiani G, Anichini A. Differential patterns of HOX gene expression are associated with specific integrin and ICAM profiles in clonal populations isolated from a single human melanoma metastasis. *Int J Cancer* 1996;66(5):692-7.

Cillo C, Faiella A, Cantile M, Boncinelli E. Homeobox genes and cancer. *Exp Cell Res* 1999;248(1):1-9.

Cohn MJ, Patel K, Krumlauf R, Wilkinson DG, Clarke JD, Tickle C. Hox9 genes and vertebrate limb specification. *Nature* 1997;387(6628):97-101.

Das N, Majumder ND, DasGupta UB. Ras gene mutations in oral cancer in eastern India. *Oral Oncol* 2000;36(1):76-80.

De Robertis EM, Oliver G, Wright CVE. Homeobox genes and the vertebrate body plan. *Scient Am* 1990;263(1):46-52.

Destro MFSS. Análise dos níveis de expressão dos membros da família HOX de genes homeobox em carcinomas espinocelulares bucais [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP; 2008.

Diez del Corral R, Storey KG. Opposing FGF and retinoid pathways: a signalling switch that controls differentiation and patterning onset in the extending vertebrate body axis. *Bioessays* 2004;26(8):857-69.

Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):9-17.

Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, et al. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol* 1999;209(2):298-307.

D'Silva NJ, Ward BB. Tissue biomarkers for diagnosis & management of oral squamous cell carcinoma. *Alpha Omegan* 2007;100(4):182-9.

Eisen, MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(25):14863-8.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002;68(10):617–21.

Fisher JL, Field CL, Zhou H, Harris TL, Henderson MA, Choong PF. Urokinase plasminogen activator system gene expression is increased in human breast carcinoma and its bone metastases-a comparison of normal breast tissue, non-invasive and invasive carcinoma and osseous metastases. *Breast Cancer Res Treat* 2000;61(1):1-12.

Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, Shah JP. Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 1993;166(4):360-5.

Furuta J, Nobeyama Y, Umebayashi Y, Otsuka F, Kikuchi K, Ushiima T. Silencing of peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human melanomas. *Cancer Res* 2006;66(12):6080-6.

Galligan CL, Baig E, Bykerk V, Keystone EC, Fish EN. Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: correlates with disease activity. *Genes and Immun* 2007;8(6):480-91.

Gehring WJ. Master control genes in development and evolution: the homeobox story. New York: Vail-Ballou Press; 1998. cap 2-3, p. 21-53.

Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4(5):361-70.

Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 2004;64(1):55-63.

Gloecker RLA. SEER cancer statistics review, 1973-1991. Bethesda MD: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Cancer Institute; 1994. Report no. NIH-94-2789.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286(5439):531–7.

Goodman FR. Limb malformations and the human HOX genes. *Am J Med Genet* 2002;112(3):256-65.

Gorski DH, Walsh K. The role of homeobox genes in vascular remodeling and angiogenesis. *Circ Res* 2000;87(10):865–72.

Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, et al. Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 2003;97(6):1464-70.

Grier DG, Thompson A, Kwasniewska A, McGonigle GJ, Halliday HL, Lappin TR. The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 2005; 205(2):154–71.

Guazzi S, Lonigro R, Pintonello L, Boncinelli E, Di Lauro R, Mavilio F. The thyroid transcription factor-1 gene is a candidate target for regulation by Hox proteins. *EMBO J* 1994;13(14):3339-47.

Harousseau JL, Shaughnessy Jr J, Richardson P. Multiple Myeloma. *Hematol* 2004;237-56.

Hassan NMM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, et al. Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res* 2006;16(5):217-24.

Hong YK, Harvey N, Noh YH, Schracht V, Hirakawa S, Detmar M, et al. Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* 2002;225(3):351-7.

Hung YC, Ueda M, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Kanda K, et al. Homeobox gene expression and mutation in cervical carcinoma cells. *Cancer Sci* 2003;94(5):437-41.

Hyndman E, Kauraniemi P, Hautaniemi S, Wolf M, Mousses S, Rozenblum E, et al. Impact of DNA amplification on gene patterns in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(21):6240-5.

Ildstad ST, Bigelow ME, Remensnyder JP. Squamous cell carcinoma of the tongue: a comparison of the anterior two-thirds with its base. *Am J Surg* 1983;146(4):456–61.

Izzo JG, Papadimitrakopoulou VA, Liu DD, den Hollander PL, Babenko IM, Keck J, et al. Cyclin D1 genotype, response to biochemoprevention, and progression rate to upper aerodigestive tract cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(3):198-205.

Jones FS, Prediger EA, Bittner DA, De Robertis EM, Edelman GM. Cell adhesion molecules as targets for Hox genes: Neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with Hox-2.5 and -2.4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(6):2086-90.

Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B. Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63:1599-605.

Kawagoe H, Humphries RK, Blair A, Sutherland HJ, Hogge DE. Expression of HOX genes, HOX cofactors, and MLL in phenotypically and functionally defined subpopulations of leukemic and normal human hematopoietic cells. *Leukemia* 1999;13(5):687–98.

Kowalski LP, Medina JE. Nodal metastases: predictive factors. *Otolaryngol Clin North Am* 1998;31(4):621-37.

Kuo WP, Hasina R, Ohno-Machado L, Lingen MW. Classification and identification of genes associated with oral cancer based on gene expression profiles. A preliminary study. *N Y State Dent J* 2003;69(2):23-6.

Kuriakose MA, Chen WT, He ZM, Sikora AG, Zhang P, Zhang ZY, et al. Selection and validation of differentially expressed genes in head and neck cancer. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(11):1372-83.

La Starza R, Trubia M, Crescenzi B, Matteucci C, Negrini M, Martelli MF, et al. Human homeobox gene HOXC13 is the partner of NUP98 in adult acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;13). *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36(4):420-3.

Laerm A, Helmbold P, Goldberg M, Dammann R, Holzhausen HJ, Balhausen WG. Prospero-related homeobox 1 (PROX1) is frequently inactivated by genomic deletions and epigenetic silencing in carcinomas of the biliary system. *J Hepatol* 2007;46(1):89-97.

Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 2003;3(4):253-66.

Lawrence HJ, Rozenfeld S, Cruz C, Matsukuma K, Kwong A, Kömüves L, et al. Frequent co-expression of the HOXA9 and MEIS1 homeobox genes in human myeloid leukemias. *Leukemia* 1999;13(12):1993–9.

Lechner JF, Fugaro JM, Wong Y, Pass HI, Harris CC, Belinsky SA. Perspective: cell differentiation theory may advance early detection of and therapy for lung cancer. *Radiat Res* 2001;155(1 pt 2):235–8.

Leemans C, Tiwari R, Nauta J, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastasis as a prognostic factor. *Cancer* 1994;73(1):187.

Lewis MT, Ross S, Strickland PA, Snyder CJ, Daniel CW. Regulated expression patterns of IRX-2, an Iroquois-class homeobox gene, in the human breast. *Cell Tissue Res* 1999;296(3):549-54.

Li L, Vassin H. Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during *Drosophila* neurogenesis. *Genes Dev* 2000;14(2):147-51.

Libório dos Santos TN. Expressão de variantes transcricionais do gene Homeobox TGIF1 em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

Lim J, Kim JH, Paeng JY, Kim MJ, Hong SD, Lee JI. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* 2005;58(11):1199-205.

Lo WL, Kao SY, Chi LY, Wong YK, Chang RCS. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61(7):751-8.

Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 1990;160(4):410–4.

Maddox WA. Vicissitudes of head and neck cancer. *Am J Surg* 1984;148(4):428–32.

Mao L, Lee J, Fan Y, Ro J, Batsakis J, Lippman S, et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignancies. *Nat Med* 1996; 2:682-5.

Mark M, Rijli FM, Chambon P. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res* 1997;42(4):421–429.

Maroulakou IG, Spyropoulos DD. The study of HOX gene function in hematopoietic, breast and lung carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003;23(3):2101-10.

Matizonkas-Antonio LF. Análise da presença de transcritos dos genes HOXA7, HOXC6 e TGIF em carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de odontologia da USP; 2005.

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous cell carcinomas is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55(4): 580–5.

Maulbecker CC, Gruss P. The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J* 1993;12(6):2361-7.

Méndez E, Cheng C, Farwell DG, Ricks S, Agoff SN, Futran ND, et al. Transcriptional expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2002;95(7):1482-94.

Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Seminars in Nuclear Med* 1978;8(4):283–298.

Mitteldorf CATS. Anatomia patológica no câncer de boca. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 13, p. 96-100.

Miyamoto K, Fukutomi T, Akashi-Tanaka S, Hasegawa T, Asahara T, Sugimura T, et al. Identification of 20 genes aberrantly methylated in human breast cancers. *Int J Cancer* 2005;116(3):407-14.

Miyamoto K, Ushijima T. Diagnostic and therapeutic applications of epigenetics. *Jpn J Clin Oncol* 2005;35(6):293-301.

Morini M, Mottolèse M, Ferrari N, Ghiorzo F, Buglioni S, Mortarini R, et al. The $\alpha 3 \beta 1$ integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion and gelatinase B (MMP-9) activity. *Int J Cancer* 2000;87:336-42.

Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis. *J Cell Biol* 2000;148(2):343-51.

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Takada K. Immunocytochemical localization of fibroblast growth factor-1 (FGF-1) and FGF-2 in oral squamous cell carcinoma (SCC). *J Oral Pathol Med* 1994;23(10):451-6.

Nagai H, Kinoshita T, Suzuki H, Hatano S, Murate T, Saito H. Identification and mapping of novel tumor suppressor loci on 6p in diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1999;25(3):277-3.

Nagai H, Li Y, Hatano S, Toshihito O, Yuge M, Ito E, et al. Mutation and aberrant DNA methylation of the PROX1 gene in hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38(1):13-21.

Nagata M, Fujita H, Ida H, Hoshina H, Inoue T, Seki Y, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. *Int J Cancer* 2003;106(5): 683-9.

Novais CM; Pires-Alves M. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 2004;jul-dez(33).

Nunes FD, de Almeida FCS, Tucci, R, de Sousa SC. Homeobox genes: a molecular link between development and cancer. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):94-8.

O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, Singhal S, Weber R, O'Malley B, et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oncogene* 2005;24(7):1244-51.

Panagopoulos I, Isaksson M, Billstrom R, Ströbermck B, Mitelman F, Johansson B. Fusion of the NUP98 gene and the homeobox gene HOXC13 in acute myeloid leukemia with t(11;12)(p15;q13). *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36(1):107-12.

Patel SG, Shah JP. Results of treatment. In: Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG, editors. *Oral Cancer*. London: Martin Dunitz; 2003. p. 387-94.

Platz H, Fries R, Hudec M, Tjoa AM, Wagner RR. The prognostic relevance of various factors at the time of first admission of the patient. Retrospective DOSAK study on carcinoma of the oral cavity. *J Maxillofac Surg* 1983;11(1):3–12.

Pomerantz RG, Grandis JR. The role of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2003;5(2):140-6.

Qiu M, Anderson S, Chen S, Meneses JJ, Hevner R, Kuwene E, et al. Mutation of the *Emx-1* homeobox gene disrupts the corpus callosum. *Develop Biol* 1996;178(1):174-8.

Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(4):423-31.

Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, et al. Compromised *HOXA5* function can limit p53 expression in human breast tumors. *Nature* 2000;405(6789):974-8.

Reddy SD, Ohshiro K, Rayala SK, Kumar R. MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res* 2008;68(20):8195-200.

Rieger E, Bijl JJ, van Oostveen JW, Soyer HP, Oudejans CBM, Jiwa NM, et al. Expression of the homeobox gene *HOXC4* in keratinocytes of normal skin and epithelial skin tumors is correlated with differentiation. *J Invest Dermatol* 1994;103(3):341-6.

Rossi Degl'Innocenti D, Castiglione F, Buccoliero AM, Bechi P, Taddei GL, Freschi G, et al. Quantitative expression of the homeobox and integrin genes in human gastric carcinoma. *Int J Mol Med* 2007;20(4):621-9.

Rubin E, Wu X, Zhu T, Cheung JC, Chen H, Lorincz A, et al. A role for the *HOXB7* homeodomain protein in DNA repair. *Cancer Res* 2007;67(4):1527-35.

Russolo M, Giacomarra V, Papanikolla L, Tirelli G. Prognostic indicators of occult metastases in oral cancer. *Laryngoscope* 2002;112(3):449-52.

Sabbaga J. Oncogenes e antioncogenes. In: Parise Junior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. cap. 4, p. 23-8.

Sakaki T, Wato M, Tamura I, Nakajima M, Morita S, Kakudo K, et al. Correlation of E-cadherin and alpha-catenin expression with differentiation of oral squamous cell carcinoma. *J Osaka Dent Univ* 1999;33(2):75-81.

Sano D, Myers JN. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Cancer Metastasis Rev* 2007;26(3-4):645-62.

Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, Leonard AG, Stephenson M, Napier SS. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2003;32(1):1-9.

Schey SA, Fields P, Bartlett JB, Clarke IA, Ashan G, Knight RD, et al. Phase I study of an immunomodulatory thalidomide analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2004; 22(16):3269-76.

Scholl P, Byers RM, Batsakis JG, Wolf P, Santini H. Microscopic cut-through of cancer in the surgical treatment of carcinoma of the tongue. Prognostic and therapeutic implications. *Am J Surg* 1986;152(4):354-60.

Scully C, Field FK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;36(4):311-27.

Sendra TJ, Dorris D, Ramakrishnan R, Nguyen A, Trakas D, Mazumder A. Expression profiling with oligonucleotide arrays: technologies and applications for neurobiology. *Neurochem Res* 2002;27(10):1005-26.

Shaha AR, Spiro RH, Shah JP, Strong EW. Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg* 1984;148(4):455-9

Shimoda M, Takahashi M, Yoshimoto T, Kono T, Ikai I, Kubo H. A homeobox protein, Prox1, is involved in the differentiation, proliferation, and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(20 Pt 1):6005-11.

Shiraishi M, Sekiguchi A, Oates AJ, Terry MJ, Miyamoto Y. HOX gene clusters are hotspots of de novo methylation in CpG islands of human lung adenocarcinomas. *Oncogene* 2002;21(22):3659-62.

Siegel S, Castellan Jr NJ. Nonparametric statistics for behavioral sciences. Statistics Series. 2nd ed. New York: McGraw-Hill International Editions; 1988.

Simionescu C, Mărgăritescu C, Surpăţeanu M, Mogoantă L, Zăvoi R, Ciurea R, et al. The study of E-cadherine and CD44 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 2008;49(2):189-93.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6(5):963-8.

Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(3 Pt 1):701-9.

Somoza-Martín JM, García-García A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Español M, Gándara-Vila P, et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2005;63(6):786-92.

Song K, Wang Y, Sassoon D. Expression of Hox-7.1 in myoblasts inhibits terminal differentiation and induces cell transformation. *Nature* 1992;360(6403):477–81.

Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002;20(11):2672-9.

Squarize CH, Castilho RM, Pinto Jr. DS. Immunohistochemical evidence of PTEN in oral squamous cell carcinoma and its correlation with the histological malignancy grading system. *J Oral Pathol Med* 2002;31(7):379-84.

Strathdee G, Holyoake TL, Sim A, Parker A, Oscier DG, Melo JV, et al. Inactivation of HOXA genes by hypermethylation in myeloid and lymphoid malignancy is frequent and associated with poor prognosis. *Clin Cancer Res* 2007a;13(17):5048-55.

Strathdee G, Sim A, Soutar R, Holyoake TL, Brown R. HOXA5 is targeted by cell-type-specific CpG island methylation in normal cells and during the development of acute myeloid leukaemia. *Carcinogenesis* 2007b;28(2):299-309.

Sutton DN, Brown JS, Rogers SN, Vaughan ED, Woolgar JA. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32(1):30–4.

Svingen T, Tonissen KF. Hox transcription factors and their elusive mammalian gene targets. *Heredity* 2006;97(2): 88-96.

Takahashi C, Akiyama N, Kitawama H, Takai S, Noda M. Possible involvement of Msx-2 homeoprotein in v-ras-induced transformation. *Leukemia* 1997;Suppl 3:340-3.

Takahashi O, Hamada J, Abe M, Hata S, Asano T, Takahashi Y, et al. Dysregulated expression of HOX and ParaHOX genes in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;17(4):753-60.

Takahashi Y, Hamada J, Murakawa K, Takada M, Tada M, Nogami I, et al. Expression profiles of 39 HOX genes in normal human adult organs and anaplastic thyroid cancer cell lines by quantitative real-time RT-PCR system. *Exp Cell Res* 2004;293(1):144-53.

Takes RP. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: Imaging techniques and biomarkers. *Oral Oncol* 2004;40(7):656-67.

Taketani T, Taki T, Ono R, Kobayashi Y, Ida K, Hayashi Y. The chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in acute myeloid leukemia results in fusion of the NUP98 gene with a HOXA cluster gene, HOXA13, but not HOXA9. *Genes Chromosomes Cancer*, 2002a;34(4):437-43.

Taketani T, Taki T, Shibuya N, Ito E, Kitazawa J, Terui K, et al. The HOXD11 gene is fused to the NUP98 gene in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q31;p15). *Cancer Res* 2002b;62(1):33-7.

Tefferi A, Bolander ME, Ansell SM, Wieben ED, Spelsberg TC. Primer on medical genomics. Part III: Microarray experiments and data analysis. *Mayo Clin Proc* 2002;77(9):927-40.

Tiberio C, Barba P, Magli MC, Arvelo F, Le Chevalier T, Poupon MF, et al. HOX gene expression in human small-cell lung cancers xenografted into nude mice. *Int J Cancer* 1994;58(4):608–15.

Tímár J, Csuka O, Remenár E, Répássy G, Kásler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):107-27.

Todd R, Donoff RB, Wong DTW. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(6):613-23.

Toruner GA, Ulger C, Alkan M, Galante AT, Rinaggio J, Wilk R, et al. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154(1):27-35.

UICC. Union Internationale Contra le Cancer. Atlas TNM: Guia ilustrado para classificação TNM/pTNM de tumores malignos. São Paulo: Fundação Oncocentro; 1992.

Uzawa N, Sonoda I, Myo K, Takahashi KI, Miyamoto R, Amagasa T. Fluorescence in situ hybridization for detecting genomic alterations of cyclin D1 and p16 in oral squamous cell carcinomas. *Cancer* 2007;110(10):2230-9.

van der Auwera I, van Laere SJ, Van den Eynden GG, Benoy I, van Dam P, Colpaert CG, et al. Increased Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Inflammatory versus Noninflammatory Breast Cancer by Real-Time Reverse Transcriptase-PCR Gene Expression Quantification. *Clin Cancer Res* 2004;10(23):7965-71.

van Oostveen J, Bijl J, Raaphorst F, Walboomers J, Meijer C. The role of homeobox genes in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Leucemia* 1999;13(11):1675-90.

Wakulich C, Jackson-Boeters L, Daley TD, Wysocki GP. Immunohistochemical localization of growth factors fibroblast growth factor-1 and fibroblast growth factor-2 and receptors fibroblast growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-3 in normal oral epithelium, epithelial dysplasias, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;93(5):573-9.

Waltregny D, Alami Y, Clausse N, de Leval J, Castronovo V. Overexpression of the homeobox gene HOXC8 in human prostate cancer correlates with loss of tumor differentiation. *Prostate* 2002;50(3):162-9.

Welham SJM, Riley PR, Wade A, Hubank M, Woolf AS. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics* 2005;22(1):48-56.

Wigle JT, Chowdhury K, Gruss P, Oliver G. Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat Genet* 1999;21(3):318-22.

Woloshin P, Song K, Degnin C, Killary AM, Goldhamer DJ, Sassoon D, et al. MSX1 inhibits myoD expression in fibroblast × 10T1/2 cell hybrids. *Cell* 1995;82(4):611–20.

Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999;35(3):257–65.

Wu Y, Moser M, Bautch VL, Patterson C. HoxB5 is an upstream transcription switch for differentiation of the vascular endothelium from precursor cells. *Mol Cell Biol* 2003;23(16):5680–91.

Wuyts W, Reardon W, Preis S, Homfey T, Rasore-Quartino A, Christian H, et al. Identification of mutations in the MSX2 homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. *Human Gnet* 2000;9(8):1251-5.

Yahagi N, Kosaki R, Ito T, Mitsuhashi T, Shimada H, Tomita M, et al. Position specific expression of Hox genes along the gastrointestinal tract. *Congenit Anom* 2004;44(1):18-26.

Yamada K, Kawata H, Matsuura K, Shou Z, Hirano S, Mizutani T, et al. Functional analysis and the molecular dissection of zinc-fingers and homeoboxes 1 (ZHX1). *Biochem Biophys Res Comm* 2002;297(2):368-74.

Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics* 2008;9:69.

Zhang X, Zhu T, Chen Y, Mertani HC, Lee KO, Lobie PE. Human growth hormone-regulated HOXA1 is a human mammary epithelial oncogene. *J Biol Chem* 2003;278(9):7580–90.

Zhou X, Temam S, Oh M, Pungpravat N, Huang B, Mao L, et al. Global Expression-Based Classification of Lymph Node Metastasis and Extracapsular Spread of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Neoplasia* 2006;8(11):925-32.

Zhu F, Li J, Li WX, Liu ZC, Long X. Overexpression and clinicopathological significance of homeobox gene Quox-1 in oral squamous cell carcinoma. *J Biochem Mol* 2004;37(6):671-5.

Ziober AF, Patel KR, Alawi F, Gimotty P, Weber RS, Feldman MM, et al. Identification of a gene signature for rapid screening of oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006;12(20 Pt 1):5960-71.

Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39(4):561-77.

ANEXO A – Parecer do CONEP

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1763/2005

Registro CONEP: 12380 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 022/05

Processo nº 25000.152864/2005-50

Projeto de Pesquisa: "Marcadores de agressividade em tumores de cabeça e pescoço".

Pesquisador Responsável: Dr. Francisco Gorgonio da Nóbrega

Instituição: Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos –SP.

Laboratório de Genética Molecular e Genomas

Área Temática Especial: Genética Humana

RESUMO:

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é uma das neoplasias mais frequentes no Brasil. Os pacientes com tumores estáticos precoces geralmente exibem poucos sintomas, o que resulta em atraso no diagnóstico e diminuição de sobrevida. Além disso, lesões histologicamente semelhantes podem apresentar diferentes comportamentos clínicos e respostas ao tratamento. Infelizmente, apesar dos esforços realizados em pesquisa sobre esses tumores e do progresso nas estratégias de detecção precoce e terapia, o seu prognóstico é ainda limitado e a taxa de sobrevida em 5 anos é baixa.

O presente estudo tem como objetivo geral investigar, em carcinoma de cabeça e pescoço, marcadores moleculares de agressividade que possam ser relevantes para prognóstico e terapia. Os objetivos específicos incluem: (1) investigar por técnicas de genômica e proteômica diferenças nos perfis de expressão gênica e proteica entre carcinomas de cabeça e pescoço e tecidos mais correspondentes, e suas relações com parâmetros clínicos e laboratoriais (estágio da doença e evolução); investigar polimorfismos genéticos associados com padrões metabólicos envolvidos na progressão do tumor; validar os marcadores moleculares identificados por meio de PCR quantitativos, imuno-histoquímica e genotipagem em um grande número de amostras.

Para atingir esses objetivos, será analisado o material coletado na fase piloto do Projeto Genoma Clínico que compreende, até o momento, 295 amostras de tumores e de 239 de margens cirúrgicas procedentes de pacientes bem caracterizados do ponto de vista clínico e de seguimento, além de 460 amostras de sangue de pacientes e 345 de controles.

Os resultados poderão contribuir para o esclarecimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações genéticas que ocorrem durante a progressão tumoral e suas relações com a constituição genética do tecido. Poderão também auxiliar na identificação de padrões metabólicos e de sinalização anormais com potencial para alvos terapêuticos.

O estudo será desenvolvido em três centros, sendo 1500 participantes. Será financiado pela FAPESP e terá a duração de quatro anos.

Cont. Parecer CONEP nº 1763/2005.

COMENTÁRIOS:

Este é um projeto de extensão do projeto "Investigação de Biomarcadores em tumores de Cabeça e Pescoço", submetido e aprovado pela Conep (Processo nº 25000.018584/98-13). Faz parte juntamente com outro projeto também aprovado pela Conep (Processo nº 25000.000713/00-46) de um projeto maior denominado "Projeto Genoma Clínico". O projeto de extensão foi enviado a Conep porque acrescentou ao projeto anterior, novos objetivos e outras modalidades de processamento das amostras de tumores (a exemplo SAGE e Microarray). A priori esse projeto não teria necessidade de vir para a Conep, o CEP a que ele foi submetido, juntamente com os projetos anteriores, poderia ter dado o parecer final.

Os TCLEs apresentados, um para sujeitos de pesquisa e outro para o grupo controle, foram adequados os novos objetivos e metodologia, e contemplam os requisitos éticos exigidos na Resolução CNS 196/96.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96 manifesta – se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Projeto aprovado.

OBS: Conforme informação no protocolo, além da Universidade do Vale do Paraíba, o estudo será conduzido nos seguintes centros: Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital Heliópolis, Faculdade de Medicina da USP e Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Caso ocorra modificação nessa informação, deve ser comunicada a CONEP. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto em questão.

Brasília, 05 de dezembro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 196/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"Expressão dos genes homeobox em Carcinomas Epidermóides de boca: análise por microarray e validação por RT-PCR quantitativo em tempo real e hibridização in situ"**, de responsabilidade da Pesquisadora **Camila de Oliveira Rodini**, sob orientação do Professor Doutor **Fábio Daumas Nunes**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 05 de dezembro de 2006

 Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
 Coordenador do CEP-FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Protocolo 196/06

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a alteração do título do projeto "Expressão dos genes homeobox em carcinomas epidermóides de boca: análise por microarray e validação por RT-PCR quantitativo em tempo real e hibridização in situ" para "Expressão de transcritos de genes homeobox no carcinoma epidermóide de boca: análise por microarray, validação por qRT-PCR e relação com critérios clínicos de agressividade", de responsabilidade do(a)

São Paulo, 01 de dezembro de 2008.

 Prof. Dr. **João Gualberto de Cerqueira Luz**
 Coordenador do CEP/FOUSP

ANEXO C – Dados clínicos e anátomo-patológicos dos 10 pacientes com carcinoma epidermóide de boca cujas amostras foram utilizadas para os experimentos de microarranjo. pT: tamanho da neoplasia através análise da peça cirúrgica; pN: envolvimento linfonodal patológico, Grau Dif: grau de diferenciação histopatológica, BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado, IS: infiltração sanguínea, IL: infiltração linfática, IP: infiltração perineural.

caso	idade	sexo	local	fumo	álcool	T	N	grau dif.	IS	IL	IP
CP2/0051	46	M	C04	sim	sim	2	2b	BD	Aus	Aus	Aus
CP1/0021	43	M	C02	sim	sim	3	0	MD	Pres	Pres	Aus
CP1/0151	47	M	C02	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Pres
CP1/0031	50	M	C04	sim	sim	3	0	BD	Aus	Pres	Pres
CP1/0178	29	M	C02	sim	sim	2	2c	MD	Aus	Pres	Pres
CP1/0080	67	M	C04	sim	sim	3	0	BD	Aus	Aus	Aus
CP2/0175	61	M	C04	sim	sim	2	2b	MD	Aus	Aus	Aus
CP3/0101	62	M	C04	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Aus
CP2/0122	56	M	C04	sim	sim	2	2b	MD	Aus	Aus	Aus
CP1/0017	55	M	C04	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Aus

ANEXO D – Dados clínicos e anátomo-patológicos dos 30 pacientes com carcinoma epidermóide de boca cujas amostras foram utilizadas para os experimentos de validação por qRT-PCR. NI: não informado, pT: tamanho da neoplasia através análise da peça cirúrgica; pN: envolvimento linfonodal patológico, Grau Dif: grau de diferenciação histopatológica, BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado, IS: infiltração sanguínea, IL: infiltração linfática, IP: infiltração perineural, II: infiltrado inflamatório, metástase: regional. As amostras sombreadas são comuns aos experimentos de microarranjo.

caso	idade	sexo	local	fumo	álcool	T	N	grau dif.	IS	IL	IP	II	metástase	recidiva	2o.tu prim	obito
CP1/0021	43	M	C02	sim	sim	3	0	MD	Pres	Pres	Aus	Mod	não	não	não	não
CP1/0040	48	M	C02	sim	sim	4	0	BD	Aus	Aus	Pres	Mod	não	não	sim	sim/neoplasia
CP1/0075	54	M	C04	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Aus	Esc	não	não	não	não
CP1/0080	67	M	C04	sim	sim	3	0	BD	Aus	Aus	Aus	Esc	não	não	não	não
CP1/0130	40	M	C04	sim	sim	4	0	MD	Aus	Aus	Pres	Esc	não	não	não	não
CP1/0151	47	M	C02	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Pres	Mod	sim	não	não	sim/neoplasia
CP1/0153	56	M	C04	sim	sim	4	0	BD	Aus	Aus	Pres	Esc	não	sim	não	sim/neoplasia
CP1/0191	63	M	C04	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Pres	Esc	não	não	não	não
CP1/0200	55	M	C02	sim	sim	3	0	MD	Aus	Pres	Pres	Esc	não	não	não	não
CP1/0258	46	M	C04	sim	sim	1	2B	BD	Aus	Pres	Aus	Esc	não	não	não	não
CP1/0262	62	M	C02	no passado	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Pres	Esc	não	não	não	não
CP1/0363	64	M	C04	sim	sim	2	2C	MD	Aus	Pres	Pres	Esc	não	não	não	não
CP1/0366	49	M	C04	no passado	sim	4	0	BD	Aus	Aus	Pres	NI	não	não	não	sim/neoplasia
CP1/0370	55	M	C04	sim	sim	4	0	BD	Aus	Aus	Pres	Esc	não	não	não	não
CP1/0384	46	M	C04	no passado	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Pres	Mod	não	não	não	não
CP2/0051	46	M	C04	sim	sim	2	2B	BD	Aus	Aus	Aus	Mod	não	sim	não	sim/neoplasia
CP2/0120	41	F	C02	no passado	não	2	1	MD	Aus	Pres	Aus	Esc	sim	não	não	sim/neoplasia
CP2/0122	56	M	C04	sim	sim	2	2B	BD	Aus	Pres	Aus	Mod	sim	não	não	sim/neoplasia
CP2/0175	61	M	C04	sim	sim	2	2B	MD	Aus	Aus	Aus	Mod	não	sim	não	sim/neoplasia
CP2/1002	59	M	C02	sim	sim	2	2C	BD	Aus	Aus	Aus	Esc	não	sim	não	sim/neoplasia
CP2/1022	44	M	C02	sim	sim	3	0	BD	Aus	Pres	Aus	Int	não	sim	não	não
CP3/0012	50	M	C04	no passado	no passado	1	1	BD	Aus	Aus	Aus	Aus	não	não	não	não
CP3/0033	51	M	C04	sim	no passado	3	0	MD	Aus	Aus	Pres	Mod	não	não	não	não
CP3/0046	75	F	C02	no passado	no passado	2	2B	MD	Aus	Aus	Aus	Mod	não	sim	sim	sim/neoplasia
CP3/0087	52	M	C02	sim	sim	2	2C	MD	Aus	Aus	Pres	Mod	não	não	não	sim/edema pulm
CP3/0101	62	M	C04	sim	sim	3	0	MD	Aus	Aus	Aus	Mod	não	não	não	não
CP3/0139	50	M	C02	sim	sim	2	2A	MD	Pres	Pres	Pres	Mod	não	não	não	não
CP3/0193	49	M	C02	no passado	no passado	2	1	BD	Aus	Aus	Aus	NI	não	não	não	não
CP3/0280	52	M	C04	sim	sim	1	2B	MD	Aus	Aus	Pres	NI	não	não	sim	não
CP3/0292	50	M	C04	sim	sim	2	2C	MD	Aus	Aus	Pres	NI	não	não	não	sim/neoplasia